



Marta Palma Gonçalves

Licenciatura em Ciências da Engenharia Biomédica

**Determinação da concentração de arsénio, e
outros elementos traço, em tecidos dos
peixes-zebra (*Danio rerio*)**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Biomédica

Orientador: Professor Doutor Mauro Guerra, Prof. Auxiliar Convi-
dado, FCT-UNL
Co-orientador: Professor Doutor Mário Diniz, Prof. Auxiliar, FCT-UNL



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Setembro, 2017

Determinação da concentração de arsénio, e outros elementos traço, em tecidos dos peixes-zebra (*Danio rerio*)

Copyright © Marta Palma Gonçalves, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade NOVA de Lisboa.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade NOVA de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

À minha mãe.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Professor Doutor Mauro Guerra, por todo o conhecimento que me transmitiu, pela paciência, apoio incondicional e boa disposição ao longo deste último ano. Ao meu co-orientador, Professor Doutor Mário Diniz, pela disponibilidade demonstrada e por todo o incentivo durante o decorrer desta dissertação.

Ao Laboratório de Engenharia Biomédica e Física da Radiação (LIBPhys-UNL) do departamento de Física da FCT-UNL, ao Laboratório de Bioquímica Ambiental do departamento de Química da FCT-UNL e ao Biotério do departamento de Ciências e Engenharia do Ambiente pelo equipamento disponibilizado para a concretização deste estudo.

A todos aqueles que me acompanharam no laboratório: Tânia, Mariana C., Mariana M., Gonçalo e Tiago. Obrigada pela amizade, ajuda e força, imprescindíveis para a realização deste trabalho.

Aos amigos com quem partilhei este cinco anos, por se terem tornado a minha segunda família. Por terem estado presentes nos bons e maus momentos e por me terem ajudado a chegar até aqui.

Um especial obrigada à minha mãe, por me fazer acreditar que não existem impossíveis, por ser o meu pilar. Para mim, será sempre a super-mulher.

A toda a minha família Palma, por conseguirem aturar-me, mesmo em dias "não".

Ao Pedro, que mesmo estando longe, consegue estar presente a cada momento. Obrigada pelo incentivo, por sempre acreditar em mim. Já foram muitos os planos e aventuras, que venham muitos mais.

A todos, o meu sincero obrigada.

RESUMO

O arsénio (As) é um elemento ubíquo presente em fertilizantes e pesticidas, causando a contaminação dos solos e alimentos e provocando a intoxicação de seres vivos, incluindo o Homem. Está associado ao desenvolvimento de diversas patologias e doenças, no entanto os seus mecanismos de ação e toxicidade ainda não são totalmente conhecidos.

Os objetivos principais deste estudo são compreender a distribuição do As nos tecidos de acordo com a exposição a diferentes concentrações e determinar alguns biomarcadores de efeito em resposta à presença deste elemento no organismo. Desta forma, será mais fácil tratar e prevenir eficazmente casos de intoxicação por As no ser humano.

Para tal, recorreu-se ao peixe-zebra (*Danio rerio*), um modelo biológico cujo genoma está descodificado, sendo que cerca de 70% dos genes codificantes do *Homo sapiens* têm um correspondente nesta espécie.

Realizaram-se ensaios de exposição semi-estáticos durante 7 dias, tendo os peixes sido divididos em três tanques: grupo de controlo, grupo exposto a 150 µg/L de As e grupo exposto a 300 µg/L de As.

Posteriormente, as amostras foram analisadas por µ-EDXRF, que nos permitiu efetuar uma análise qualitativa da distribuição do As nos diversos órgãos do peixe-zebra, através do mapeamento das amostras, assim como uma análise quantitativa das mesmas. As amostras foram também analisadas através de EDXRF com geometria triaxial e ICP-AES no sentido de quantificar a bioacumulação total do As nos organismos dos peixes. No final, realizou-se ainda um estudo relativo à atividade enzimática de vários biomarcadores: LPO, GST, GPX, SOD, CAT e Ub.

Através das técnicas utilizadas, observou-se que a concentração de As foi superior nos peixes do grupo exposto a uma maior concentração de As, e que este se acumulou essencialmente nas vísceras, em particular na zona dos intestinos. Quanto aos biomarcadores, a LPO, GPX, SOD e Ub foram os que apresentaram diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo de controlo.

Palavras-chave: As, peixe-zebra, µ-EDXRF, EDXRF com geometria triaxial, ICP-AES, biomarcador

ABSTRACT

Arsenic (As) is a ubiquitous element present in fertilizers and pesticides, causing soil and food contamination and intoxication of living beings, including Man. It is associated with the development of several pathologies and diseases, however, its mechanisms of action and toxicity are not yet fully known.

The main goals of this study are to understand in which tissues As is deposited according to its different concentrations and to determine several biomarkers activated in response to the presence of this element in the organism. In this way, it will be easier to effectively treat and prevent cases of As intoxication in humans.

For this purpose, we used zebrafish (*Danio rerio*) as a biological model; its genome is decoded and about 70% of the *Homo sapiens*'s encoding genes have a corresponding one in this species.

Semi-static exposure tests were performed for 7 days, and the fish were divided into three tanks: control group, group exposed to 150 $\mu\text{g/L}$ of As and group exposed to 300 $\mu\text{g/L}$ of As.

Subsequently, the samples were analysed by μ -EDXRF, which allowed us to perform a qualitative analysis, through the mapping of the samples, as well as a quantitative analysis. The samples were also analysed by EDXRF with triaxial geometry and ICP-AES in order to quantify the total bioaccumulation of As in fish organisms. At the end, a study was performed on the enzymatic activity of several biomarkers: LPO, GST, GPX, SOD, CAT and Ub.

Through the techniques used, we observed that the concentration of As was higher in the fish of the group exposed to a higher concentration of As, and that this accumulated essentially in the viscera, in particular in the intestines. Regarding the biomarkers, LPO, GPX, SOD and Ub were those which presented statistically significant differences.

Keywords: As, zebrafish, μ -EDXRF, EDXRF with triaxial geometry, ICP-AES, biomarker

ÍNDICE

Lista de Figuras	xvii
Lista de Tabelas	xix
Siglas	xxi
1 Introdução	1
1.1 Contextualização e objetivos	1
1.2 Estado da arte	2
2 O arsénio	5
2.1 Mecanismos de exposição e envenenamento	5
2.2 Características e toxicidade	6
2.3 Mecanismos fisiológicos e biomarcadores	7
3 O peixe-zebra	9
3.1 Organismo modelo	9
3.2 Comparação entre organismos modelo	10
3.3 A anatomia e a fisiologia do peixe-zebra	10
4 Técnicas e princípios físicos	13
4.1 Raios-X	13
4.2 Interação de radiação com a matéria	14
4.3 Efeito fotoelétrico	15
4.4 Dispersão de Rayleigh	15
4.5 Efeito de Compton	16
4.6 Fluorescência de Raios-X	16
4.6.1 Fluorescência de Raios-X por Dispersão em Energia (EDXRF)	17
4.6.1.1 μ -EDXRF	18
4.6.1.2 EDXRF com geometria triaxial	19
4.6.1.3 Artefactos espectrais	20
4.6.1.4 Métodos de quantificação e calibração	20
4.6.1.5 Limites de deteção	21
4.6.1.6 Incertezas associadas	21

4.6.2	Espetrometria de Emissão Atômica por Plasma Induzido (ICP-AES)	22
5	Materiais e métodos	25
5.1	Bioensaios	25
5.1.1	Primeiro bioensaio	26
5.1.2	Segundo bioensaio	27
5.1.3	Bioensaio para estudo enzimático	27
5.2	Preparação das amostras	28
5.2.1	Amostras para EDXRF e ICP-AES	28
5.2.2	Amostras para estudo enzimático	28
5.3	Análise por EDXRF	29
5.3.1	μ -EDXRF	29
5.3.2	EDXRF com geometria triaxial	29
5.4	Análise por ICP-AES	30
5.5	Estudo Enzimático	30
5.5.1	Peroxidação Lipídica (LPO)	30
5.5.2	Glutathione S-Transferase (GST)	30
5.5.3	Peroxidase de Glutathione (GPX)	31
5.5.4	Superóxido Dismutase (SOD)	31
5.5.5	Catalase (CAT)	31
5.5.6	Ubiquitinas (Ub)	31
5.6	Análise estatística	31
6	Análise e discussão dos resultados	33
6.1	Análise por μ -EDXRF	33
6.2	Análise por EDXRF com geometria triaxial	41
6.3	Análise por ICP-AES	41
6.4	Comparação de resultados	42
6.5	Análise dos biomarcadores	44
6.5.1	Peroxidação Lipídica (LPO)	44
6.5.2	Glutathione S-Transferase (GST)	45
6.5.3	Peroxidase de Glutathione (GPX)	46
6.5.4	Superóxido Dismutase (SOD)	47
6.5.5	Catalase (CAT)	48
6.5.6	Ubiquitinas (Ub)	49
7	Conclusões e trabalhos futuros	51
	Bibliografia	53
A	Valores associados à μ-EDXRF	67
B	Valores associados à EDXRF com geometria triaxial	71

C	Valores asociados à ICP-AES	73
D	Valores asociados à atividade enzimática	75
E	Valores asociados à análise estatística	77

LISTA DE FIGURAS

2.1	Esquema ilustrativo das principais fontes de arsénio	5
3.1	Figura representativa dos principais órgãos do peixe-zebra (adaptado de [58])	11
4.1	Representação de possíveis transições eletrónicas (adaptado de [62])	14
4.2	Esquema representativo do Efeito fotoelétrico (adaptado de [66])	16
4.3	Esquema representativo do Efeito de Compton (adaptado de [66])	17
4.4	Representação da geometria da μ -EDXRF (adaptado de [74])	18
4.5	Mapeamento de um fóssil de um peixe de água doce [76]	19
4.6	Esquema da geometria triaxial. A - tubo de raios-X; B - alvo secundário; C - amostra; D - detetor (adaptado de [79])	20
5.1	Tanques correspondentes aos grupos A, B e C	26
5.2	Peixes-zebra	26
5.3	Montagem de uma amostra num slide	28
5.4	Espectrómetro M4 TornadoTM, Bruker	29
6.1	Mapeamento de um peixe pertencente ao Grupo A (300 ppb de As)	33
6.2	Mapeamento de um peixe pertencente ao Grupo B (150 ppb de As)	34
6.3	Mapeamento de um peixe pertencente ao Grupo C (controlo)	34
6.4	Mapeamento de um peixe pertencente ao Grupo C (C2) com comida rica em Fe e Cu nos intestinos	35
6.5	Concentração elementar média de arsénio obtida para o peixe por inteiro.	36
6.6	Concentração elementar média de arsénio obtida para as áreas correspondentes aos a) intestinos, b) vísceras dos peixes analisados.	36
6.7	Concentração elementar média de ferro nos peixes pertencentes ao Grupo C em cada área analisada	37
6.8	Concentração elementar média de ferro nos peixes pertencentes ao Grupo B em cada área analisada	37
6.9	Concentração elementar média de ferro nos peixes pertencentes ao Grupo A em cada área analisada	38
6.10	Concentração elementar média de cobre nos peixes pertencentes ao Grupo C em cada área analisada	38

6.11	Concentração elementar média de cobre nos peixes pertencentes ao Grupo B em cada área analisada	39
6.12	Concentração elementar média de cobre nos peixes pertencentes ao Grupo A em cada área analisada	39
6.13	Relação entre a concentração elementar média de ferro e cobre em todos os peixes analisados	40
6.14	Correlação entre a) cobre e arsénio, b) ferro e arsénio	40
6.15	Concentração elementar média de arsénio em cada grupo	41
6.16	Concentrações elementares de a) cobre, b) ferro obtidas através da EDXRF com geometria triaxial	42
6.17	Concentração elementar média de arsénio em cada grupo.	43
6.18	Concentrações elementares médias a) de cobre, b) de ferro obtidas através de ICP-AES.	43
6.19	Comparação da concentração média de arsénio por grupo em cada técnica	44
6.20	Comparação da concentração média a) de cobre, b) de ferro por grupo em cada técnica	44
6.21	Comparação dos diferentes níveis de concentração de MDA em relação ao grupo de controlo e os expostos a arsénio	45
6.22	Comparação dos diferentes níveis de atividade da GST em relação ao grupo de controlo e os expostos a arsénio	46
6.23	Comparação dos diferentes níveis de atividade da GPX em relação ao grupo de controlo e os expostos a arsénio.	47
6.24	Comparação das diferentes percentagens de inibição da SOD em relação ao grupo de controlo e os expostos a arsénio.	48
6.25	Comparação das diferentes percentagens de atividade da CAT em relação ao grupo de controlo e os expostos a arsénio	49
6.26	Comparação das diferentes concentrações de ubiquitinas em relação ao grupo de controlo e os expostos a arsénio.	50

LISTA DE TABELAS

5.1	Dados dos indivíduos do 1º bioensaio	27
5.2	Dados dos indivíduos do 2º bioensaio	27
A.1	Comparação dos valores de referência da amostra-padrão <i>Oyster Tissue</i> com as concentrações elementares medidas (*Valor não certificado)	67
A.2	Comparação dos valores de referência da amostra-padrão <i>Orchard Leaves</i> com as concentrações elementares medidas (*Valor não certificado)	68
A.3	Dados associados à concentração elementar média de As, Fe e Cu obtida em função das áreas analisadas, para o Grupo A	68
A.4	Dados associados à concentração elementar média de As, Fe e Cu obtida em função das áreas analisadas, para o Grupo B	68
A.5	Dados associados à concentração elementar média de As, Fe e Cu obtida em função das áreas analisadas, para o Grupo C	68
A.6	Dados associados à concentração elementar média de As, Fe e Cu obtida em função das áreas analisadas, para o Grupo A	69
A.7	Dados associados à concentração elementar média de As, Fe e Cu obtida em função das áreas analisadas, para o Grupo B	69
A.8	Dados associados à concentração elementar média de As, Fe e Cu obtida em função das áreas analisadas, para o Grupo C	69
B.1	Dados associados à concentração elementar média de As, Fe e Cu obtida em cada grupo através da EDXRF com geometria triaxial	71
C.1	Dados associados à concentração elementar média de As, Fe e Cu obtida em cada grupo através de ICP-AES	73
D.1	Resultados obtidos para cada biomarcador estudado	75
E.1	Análise estatística realizada para μ -EDXRF em relação à concentração de As por área.	77
E.2	Análise estatística realizada para μ -EDXRF em relação à concentração de Cu e Fe do peixe por inteiro	77
E.3	Análise estatística realizada para EDXRF com geometria triaxial em relação à concentração de As, Cu e Fe	77

E.4	Análise estatística realizada para ICP-AES em relação à concentração de As, Cu e Fe.	78
E.5	Análise estatística realizada para os biomarcadores estudados.	78

SIGLAS

CAT	Catalase.
DL	Limite de Detecção.
DMA	Ácido Dimetilarsínico.
EDXRF	Fluorescência de Raios-X por Dispersão em Energia.
GPX	Peroxidase de Glutathione.
GSH	Glutathione Reduzida.
GST	Glutathione S-Transferase.
ICP-AES	Espetroscopia de Emissão Atômica por Plasma Induzido.
LPO	Peroxidação Lipídica.
MDA	Malondialdeído.
MMA	Ácido Monometilarsónico.
MT	Metalotioneína.
μ -EDXRF	Micro-Fluorescência de Raios-X por Dispersão em Energia.
ROS	Espécies Reativas ao Oxigénio.
SOD	Superóxido Dismutase.

SIGLAS

SP Proteínas de Stress.

Ub Ubiquitinas.

XRF Fluorescência de Raios-X.

INTRODUÇÃO

1.1 Contextualização e objetivos

De acordo com a ATSDR, do inglês *Agency for Toxic Substances and Disease Registry*, o arsénio (As) é um dos elementos mais perigosos devido à frequência cada vez maior em que ocorre no ambiente, à sua toxicidade e exposição ao ser humano [1]. É um poluente encontrado por todo o mundo e possui um enorme impacto a nível global [2].

A crescente contaminação por arsénio dos solos, da água e dos alimentos, em resultado das atividades industriais e da agropecuária, tem levado a que o número de casos de intoxicação no Homem tenha vindo a aumentar [3], tendo-se tornado um problema de saúde pública a nível mundial [4]. A exposição ao arsénio encontra-se relacionada com o desenvolvimento de diversos tipos de cancro e uma diversidade de outras patologias que podem afetar praticamente todos os órgãos do corpo humano [5]. É assim importante compreender os mecanismos de ação e a toxicocinética deste elemento, assim como a relação entre a concentração de arsénio no organismo e os efeitos nocivos provocados por este.

Para estudar e tentar compreender melhor os efeitos e os mecanismos deste elemento sobre os organismos vivos expusemos peixes-zebra (*Danio rerio*) a diferentes concentrações de arsénio na água. Para além desta espécie ser considerada um organismo modelo em diversos estudos de biomedicina, sabe-se que cerca de 70% do genoma de referência humano tem pelo menos um ortólogo nos peixes-zebra [6]. Significa assim que ao estudar e analisar os efeitos da toxicidade e os mecanismos de resposta relacionados com o arsénio nos peixes-zebra, poderemos efetuar uma correlação com o ser humano, de forma a prevenir e tratar mais eficazmente a intoxicação causada por este elemento [7].

A exposição dos peixes-zebra ao arsénio realizou-se no Biotério do Departamento de Ciências e Engenharia do Ambiente da FCT-UNL. Seguidamente prepararam-se as

amostras, posteriormente analisadas através de várias técnicas: [Micro-Fluorescência de Raios-X por Dispersão em Energia \(\$\mu\$ -EDXRF\)](#) e [Fluorescência de Raios-X por Dispersão em Energia \(EDXRF\)](#) com geometria triaxial no Laboratório de Física Atômica e Molecular do Departamento de Física da FCT-UNL, e [Espectroscopia de Emissão Atômica por Plasma Induzido \(ICP-AES\)](#), no Departamento de Química da FCT-UNL. Desta forma tornou-se possível identificar e quantificar os elementos presentes em cada uma das amostras, nomeadamente o As, bem como localizar a deposição do mesmo nos órgãos internos do peixe. Posteriormente efetuou-se um estudo, no Departamento de Química da FCT-UNL, acerca da atividade enzimática dos peixes por forma a compreendermos o papel de várias enzimas (biomarcadores) no organismo perante a presença de As.

1.2 Estado da arte

A quantificação e a presença de metais pesados e elementos traço em tecidos biológicos recorrendo às diferentes técnicas de EDXRF e ICP-AES tem sido realizada por diversos autores ao longo das últimas décadas. Por exemplo, vários investigadores aplicaram estas técnicas a tecidos humanos. Carvalho *et al.*, recorreram à EDXRF para analisar tecidos dos rins, fígado, osso e cabelo provenientes de cadáveres e detetar concentrações de Cl, K, Ca, Mn, Fe, Cu, Zn, As, Se, Br, Rb, Sr e Pb [8] nas formas em que se encontram, com o intuito de compreenderem a correlação entre elementos-traço e as suas concentrações em diferentes tecidos biológicos. Utilizaram também esta técnica para comparar as concentrações de vários elementos traço em tecidos saudáveis e em tecidos cancerígenos [9], tendo observado que os níveis de Zn e Br eram inferiores nos tecidos cancerígenos, enquanto que os restantes elementos eram superiores, em comparação com os tecidos saudáveis. Yaman efetuou também um estudo de elementos traço em tecidos com neoplasias, todavia recorreu à técnica de ICP-AES [10]. Al-Ebraheem *et al.* utilizaram a técnica de μ -EDXRF para determinar a concentração de Fe, Cu e Zn em tecido renal e hepático saudável e cancerígeno humano [11], tendo observado uma diminuição de Zn nos dois tipos de tecido cancerígeno.

Vários investigadores realizaram estudos com peixes e crustáceos, como é o caso de Mohapatra *et al.*, que comprovaram a eficácia da EDXRF em tecidos de organismos aquáticos ao testarem a presença de vários elementos em diferentes espécies de crustáceos [12]. Unlu *et al.* testaram a concentração de metais pesados em várias espécies de peixes através de ICP-AES [13].

Alonso-Hernández *et al.* [14] analisaram a presença de As em tecidos musculares de peixes, moluscos e crustáceos também através de EDXRF, tendo observado uma maior concentração total de As nos crustáceos. Vicente-Martorell *et al.* recorreram à técnica de ICP-AES para analisar a concentração de arsénio e outros elementos (Cu, Zn, Cd e Pb) em duas espécies de peixes: dourada (*Sparus aurata*) e solha (*Solea senegalensis*). Compararam-se as concentrações dos elementos sob estudo em três órgãos dos peixes e observaram-se as seguintes relações: para a dourada, concentração nos músculos>brânquias>fígado; para

a solha, concentração no fígado>brânquias>músculo [15], significando que os resultados dependem bastante da espécie em questão.

Desta forma, podemos concluir que as técnicas de EDXRF e ICP-AES possibilitam uma análise qualitativa e quantitativa de elementos traço, tais como o arsénio, em vários tecidos biológicos, nomeadamente de peixes.

Uma das espécies de peixes mais comuns na investigação em toxicologia é o peixe-zebra. É um organismo modelo cada vez mais utilizado para avaliar a toxicocinética de vários elementos, como a do arsénio, ou até de drogas. Vários estudos demonstraram a semelhança entre o perfil de toxicidade dos mamíferos e desta espécie de peixe [16].

Hallauer *et al.* recorreram ao peixe-zebra para avaliar os efeitos da exposição crónica ao arsénio e simular as doenças no ser humano causadas por este elemento. Apesar de não ser um modelo perfeito, em particular para avaliar o efeito carcinogénico, permitiu efetuar uma ponte entre as patologias observadas no peixe e as observadas no Homem [17].

Nayak *et al.* estudaram o efeito de baixas concentrações de arsénio na desregulação do sistema imunitário inato dos peixes-zebra. Tal estudo deveu-se ao facto de muitas das patologias observadas no ser humano associadas ao arsénio estarem relacionadas com este sistema, nomeadamente a inflamação e cancro. Observaram que o arsénio suprime parte das funções do sistema imunitário do peixe-zebra para baixas concentrações, tendo-se observado efeitos semelhantes aos do Homem [18]. Não foram efetuados, tanto quanto sabemos, nenhum estudo da distribuição elementar de arsénio nos diversos órgãos do peixe-zebra, nem correlacionando estes dados com os dos biomarcadores de stress oxidativo.

Por forma a avaliar os efeitos do arsénio em peixes-zebra, foram efetuados vários estudos recorrendo a biomarcadores, cuja presença no organismo é indicadora da ação deste tóxico.

Um desses estudos foi realizado por Sunaina *et al.* [19]; neste expuseram-se peixes-zebra a diferentes concentrações de As (0.006 mg/L e 0.03 mg/L) durante 7, 14, 21 e 28 dias e observou-se uma diminuição da atividade da Catalase (CAT) e aumento da peroxidação lipídica (LPO) nos peixes expostos em relação ao grupo de controlo.

Diferentes biomarcadores foram utilizados para atestar os efeitos do As em outras espécies. Bagnyukova *et al.* [20] submeteram peixes-dourados (*Carassius auratus*) a 200 µM de arsenito (As-III) durante 7 dias e verificaram alterações não só na atividade da CAT como também na atividade do Superóxido Dismutase (SOD), e no nível de Peroxidase de Glutathione (GPX).

Podemos assim concluir que o uso de biomarcadores, especialmente quando em combinação, produz informação relevante acerca da resposta à toxicidade do meio em que os peixes se encontram.

O ARSÉNIO

2.1 Mecanismos de exposição e envenenamento

O arsénio é um elemento traço a nível biológico e geológico, sendo a sua concentração média na superfície terrestre inferior a 1000 mg/Kg [21]. Ocorre naturalmente e pode ser libertado para a natureza devido às atividades antropogénicas, tais como agricultura e atividade industrial [22]. Na Figura 2.1 pode observar-se um esquema representativo das fontes de arsénio mais frequentes [23].

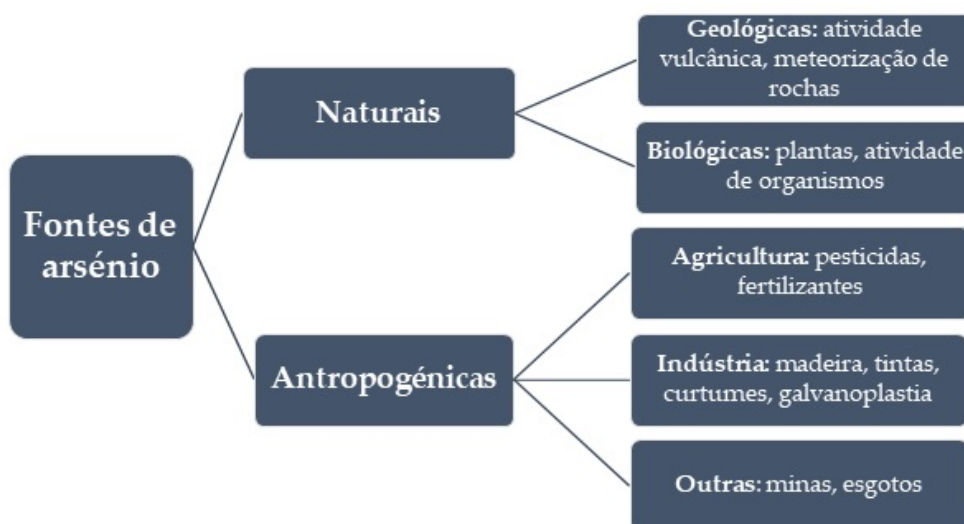


Figura 2.1: Esquema ilustrativo das principais fontes de arsénio

O principal meio de exposição para o Homem ocorre através da ingestão de água ou de alimentos contaminados, em média 20-300 µg/dia. A exposição através da inalação é menos recorrente, sendo esta superior em cidades industrializadas e poluídas e mais significativa em fumadores, uma vez que é um elemento encontrado no tabaco [24].

Dependendo do tempo de exposição ao arsénio e da sua concentração, o envenenamento pode ser considerado crónico ou agudo.

O envenenamento agudo ocorre quando um indivíduo é exposto a uma concentração elevada de arsénio num curto período de tempo. Regra geral, tal sucede devido a ingestão de pesticidas ou inseticidas. Neste caso, estima-se que a dose letal de arsénio inorgânico no ser humano seja cerca de 0.6 mg/Kg/dia [25].

Após entrar no organismo, aproximadamente 50% da dose ingerida é expelida através da urina entre 3 a 5 dias após a exposição [25]. Os sintomas de intoxicação aguda manifestam-se em todo o corpo, sendo o sistema gastrointestinal o primeiro a reagir, causando náuseas, vómitos, salivacão excessiva, cólicas abdominais e diarreia [25]. Outros sintomas possíveis são, por exemplo, cardiomiopatia e hipotensão [26].

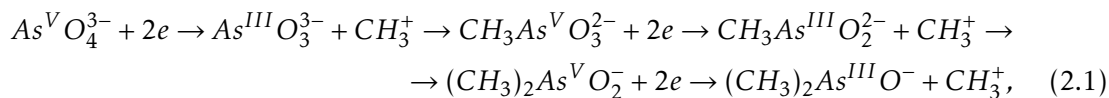
Quando um indivíduo é exposto a concentrações consideráveis de arsénio durante um longo período de tempo, sofre uma intoxicação crónica. O sistema cardiovascular é dos mais afetados, provocando hipertensão e doença cardiovascular. Pode também ocorrer neuropatia e hepatite, sendo esta última acompanhada por um aumento de enzimas hepáticas [26]. Outro efeito possível é o desenvolvimento de cancro de pele, pulmões, fígado, bexiga ou rins [27].

2.2 Características e toxicidade

O As é um metalóide, ou seja, possui propriedades metálicas e não-metálicas, sendo considerado um metal pesado em toxicologia. O seu símbolo químico é As, tem massa atómica relativa 74.92 e número atómico 33. Para a camada K do As, a energia de ionização é 11.88 eV. Depois de o átomo estar ionizado, um electrão da camada 2p pode decair para a lacuna da camada K dando origem a uma transição $K\alpha$, ou um electrão da camada 3p pode decair para a lacuna da camada K e dar origem a uma transição $K\beta$, podendo ainda ocorrer transições de qualquer outra camada mas com probabilidades muito menores. O As possui vários isótopos, sendo o mais estável o ^{75}As , cuja configuração eletrónica é $1s^2 2s^2 2p^6 3s^2 3p^6 3d^{10} 4s^2 4p^3$, podendo ter diferentes estados oxidativos (-3, 0, +3 e +5) e surgir na Natureza nas formas orgânica ou inorgânica.

As espécies inorgânicas são as mais tóxicas e consideradas carcinogénicas. Surgem quando o arsénio se combina com enxofre, cloro ou oxigénio; as espécies mais comuns são o As-III e o As-V, sendo a primeira a mais tóxica de todas [26]. Estas surgem na Natureza essencialmente sob a forma de arsenito (AsO_3^{3-}) e arsenato (AsO_4^{3-}), respetivamente [5].

Após entrar no metabolismo dos seres vivos, regra geral o As-V sofre uma conversão metabólica e é reduzido a As-III. Este pode sofrer uma metilação, ou seja, adição de um ou mais grupos metilo (CH_3), transformando-se em espécies orgânicas, tais como os **Ácido Monometilarsónico (MMA)** ou **Ácido Dimetilarsínico (DMA)** [28]. Este é considerado um mecanismo de desintoxicação, uma vez que as espécies orgânicas são mais facilmente expelidas do organismo [26]; tal processo ocorre maioritariamente no fígado [29]. A Equação 2.1 demonstra este processo [30].



onde,

$\text{As}^{\text{V}}\text{O}_4^{3-}$ é As-V inorgânico (arsenato);

$\text{As}^{\text{III}}\text{O}_3^{3-}$ é As-III inorgânico (arsenito);

$\text{CH}_3\text{As}^{\text{V}}\text{O}_3^{2-}$, $\text{CH}_3\text{As}^{\text{V}}\text{O}_2^-$ são MMAs;

$(\text{CH}_3)_2\text{As}^{\text{V}}\text{O}_2^-$, $(\text{CH}_3)_2\text{As}^{\text{III}}\text{O}^-$ são DMAs.

Pode também ocorrer uma reação de oxidação, na qual o As-III pode transformar-se em As-V.

2.3 Mecanismos fisiológicos e biomarcadores

O As-V sob a forma de arsenato $\text{As}^{\text{V}}\text{O}_4^{3-}$ é a forma de arsênio predominante nos solos, pelo que é a principal espécie a entrar no organismo dos animais [31], sendo maioritariamente absorvida no intestino delgado [25].

Após a sua absorção, o arsenato pode entrar diretamente nas células ou sofrer conversão em arsenito, sendo o último caso o mais provável.

Caso não sofra conversão, como o arsenato é análogo do fosfato (PO_4^{3-}), este entra nas células através dos seus transportadores. Esta forma de arsênio substitui o fosfato em vários processos biológicos, interferindo por exemplo na síntese de ATP ou na fosforilação oxidativa [3]. Pode também depositar-se em tecidos ósseos devido ao mesmo mecanismo de substituição na hidroxiapatite de cálcio [32], cuja fórmula é $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. Isto resulta no aumento da porosidade do osso, podendo assim o As-V estar relacionado com a osteoporose [33] [34].

Caso sofra conversão em arsenito, este apresentar-se-á sob a forma de trióxido de arsénio (As_2O_3), que se dissolve e forma $\text{As}(\text{OH})_3$ [35], entrando nas células predominantemente através de aquagliceroporinas (AQPs) [36]. Estas são proteínas de membrana que funcionam como poros [37], responsáveis pelo transporte de pequenos solutos neutros e polióis (álcoois contendo grupos hidroxilo), tais como o glicerol e a ureia [38]. Por ser o equivalente inorgânico de um poliálcool, o $\text{As}(\text{OH})_3$ é transportado para o interior das células através das AQPs, tendo as AQP7 e as AQP9 um papel preponderante. As AQP7 existem maioritariamente nos rins, tecido adiposo e testículos, e as AQP9 no fígado, intestinos, baço e cérebro, mas não nas células epiteliais da barreira hematoencefálica [37].

Após a sua entrada nas células, como o As-III possui uma alta afinidade para substâncias que contenham um grupo tiol (constituído por enxofre e hidrogénio), ocorre uma alteração da integridade da membrana das mitocôndrias [39], induzindo uma diminuição brusca do seu potencial e uma perda da organização interna deste organelo [26]. Esta afinidade provoca também danos em proteínas de tecidos da mucosa gastrointestinal, fígado, pulmões, rins, baço, e tecidos ricos em queratina [25].

Complementarmente, o arsénio induz ainda a degradação oxidativa de lípidos, denominada por **Peroxidação Lipídica (LPO)**, que ocorre principalmente nos ácidos gordos polinsaturados constituintes das membranas celulares [40], tendo o **Malondialdeído (MDA)** como o principal produto resultante, substância considerada mutagénica e carcinogénica [41].

A entrada de As-III nas células estimula também a produção de **Espécies Reativas ao Oxigénio (ROS)** compostas por radicais livres, tais como o singlete de oxigénio, radical superóxido, radical hidroxilo e peróxido de hidrogénio (H_2O_2) [42]. Estes podem provocar danos celulares, nomeadamente ao nível do ácido desoxirribonucleico (ADN), fazendo com que a célula entre em stress oxidativo [43].

Um dos mecanismos de defesa ativados quando a célula entra em stress é a síntese de **Glutathione S-Transferase (GST)**, uma família de enzimas presentes maioritariamente no citosol, que catalisam a conjugação da **Glutathione Reduzida (GSH)** com vários agentes xenobióticos, auxiliando à desintoxicação da célula [44]. Caso a célula esteja perante a presença de peróxidos, tais como H_2O_2 , é a **Peroxidase de Glutathione (GPX)** a catalisar a reação entre a GSH e o peróxido [45].

Outras enzimas antioxidantes produzidas para desintoxicarem as células são o **Superóxido Dismutase (SOD)** e a **Catalase (CAT)** [17]. Caso a molécula de ROS seja o superóxido (O_2^-), este é convertido a H_2O_2 pela SOD, sendo por fim a molécula convertida em água e oxigénio pela CAT [19] [46].

Outro dos efeitos causados pela entrada do As-III nas células é o aumento da expressão de várias **Proteínas de Stress (SP)**. Estas existem naturalmente na células e são responsáveis pela manutenção da homeostasia interna ao auxiliarem no transporte e folding de proteínas acabadas de sintetizar [47]. Existem várias SP, tais como as **Metalotioneína (MT)**, as proteínas de choque térmico Hsp60 e Hsp70 e as **Ubiquitinas (Ub)**.

As MT são proteínas citosólicas capazes de se ligarem ao As-III por possuírem vários grupos tiol, evitando que o arsénio se ligue a outras substâncias [48]; as Hsp60 e Hsp70 são chaperones moleculares que previnem a agregação e translocação de proteínas cujo folding não ocorreu corretamente devido à ação do As-III [47]; as Ub, quando ativadas, conjugam-se com as proteínas danificadas pelo As-III e promovem a sua degradação através de proteossomas ou lisossomas [47].

Desta forma, a presença no organismo de substâncias como MDA, GST, GPX, SOD, CAT, MT, Hsp60, Hsp70 e Ub podem ser utilizados como biomarcadores de efeito da exposição ao arsénio, sendo que as alterações dos níveis considerados normais refletem a interação entre o sistema biológico e um elemento que seja prejudicial a este [48] [49].

O PEIXE-ZEBRA

3.1 Organismo modelo

O peixe-zebra (*Danio rerio*) é um peixe teleósteo de água-doce pertencente à família dos ciprinídeos [50]. É um vertebrado poiquilotérmico, omnívoro, com um tempo médio de vida que varia entre os 3 e os 5 anos [7]. É um organismo diplóide e possui 25 cromossomos, mais dois que a espécie humana [51].

Esta espécie começou por ser utilizada como organismo modelo em biologia e biomedicina por diversas razões. As principais prendem-se com o facto de serem de custo reduzido e pequenos, quer em adultos quer no estado larvar, não sendo necessário aquários de grandes dimensões para os manter. Para além disto, a sua fecundação é externa, são geradas grandes quantidades de ovos (200-300) por cada vez que se reproduzem e possuem um curto período de gestação. Para além disto, os seus embriões são transparentes, o que permite a observação dos traços fenotípicos desde bastante cedo [52].

O genoma do peixe-zebra está decodificado e acessível. Foi efetuada uma comparação entre este genoma e o humano, revelando que 71,4% dos genes humanos têm pelo menos um ortólogo no peixe-zebra, ou seja, possuem a mesma função e partilham o ancestral [6].

Graças a todas as suas características, o peixe-zebra tem sido utilizado para os mais variados fins, tais como ajudar à compreensão dos processos evolutivos e mecanismos de várias doenças nos vertebrados [51], ou como auxílio na avaliação da toxicidade de fármacos, metais-pesados ou diversos tipos de nanomateriais, incluindo nanopartículas [53] [52] [54] [55] [56].

3.2 Comparação entre organismos modelo

Existem vários organismos modelo cujo genoma já foi sequenciado, sendo necessário averiguar qual o mais apropriado para cada tipo de estudo.

Os roedores (ratinho e rato) são dos animais mais utilizados, no entanto não são os mais indicados para estudar a toxicidade causada pelo arsénio. Tal deve-se ao facto de existirem discrepâncias entre o metabolismo deste metalóide nestes animais e nos humanos.

Por exemplo, em comparação com os humanos, no rato: o As acumula-se nos eritrócitos, permanece mais tempo no organismo por apresentarem uma taxa de eliminação através da urina inferior à do Homem e a sua metilação é também mais acentuada. Como consequência, estes animais são mais suscetíveis ao arsénio.

Para além disto, com roedores é um desafio garantir uniformidade da exposição ao As dos vários indivíduos. Este é dissolvido na água que será consumida, todavia é bastante difícil garantir que o consumo dessa água seja igual para todos [17].

Os peixes-zebra possuem ainda um baixo custo associado e, por serem de pequeno porte, não requerem autorizações e pareceres de comissões de ética que tornariam inviável o estudo no âmbito de uma dissertação de mestrado.

Desta forma, o peixe-zebra é o organismo modelo indicado para melhor compreendermos os mecanismos de toxicidade do arsénio uma vez que a exposição pode ser realizada através da água dos aquários onde se encontram.

3.3 A anatomia e a fisiologia do peixe-zebra

Para utilizar o peixe-zebra como organismo modelo é necessário compreender as semelhanças e as diferenças entre a sua anatomia e a do ser humano.

O peixe-zebra possui um esqueleto composto por cartilagem e osso, não possuindo, no entanto, medula óssea. Assim como na espécie humana, apresenta três tipos de tecido muscular – liso, estriado esquelético e estriado cardíaco.

Este animal possui diencéfalo, cerebelo e telencéfalo (apenas com córtex rudimentar), assim como um sistema nervoso com componentes sensoriais e motoras. Tem órgãos sensoriais especializados e função neuronal integrada.

Ao nível do sangue e do sistema imunitário, possui eritrócitos e trombócitos nucleados, leucócitos, linfócitos e células mielóides.

O seu coração apresenta apenas uma aurícula e um ventrículo, não existindo distinção entre a circulação do lado esquerdo e direito como ocorre nos humanos [7].

A sua respiração dá-se através das brânquias: a água entra através da abertura bucal, atravessa as brânquias e sai pelo opérculo.

Possui uma bexiga natatória, que através de um sistema de controlo complexo auxilia na flutuação, permitindo a deslocação vertical na coluna de água [57]. Esta bexiga liga-se ao esófago através do ducto pneumático [58].

O seu sistema gastrointestinal assemelha-se ao do Homem, todavia apresenta um bulbo intestinal ao invés de estômago. Ao nível do sistema renal e urinário, a filtração ocorre nos rins e não possui nem próstata nem bexiga.

A maioria das estruturas do sistema endócrino do peixe-zebra é semelhante às do Homem, contudo existem algumas diferenças. Uma delas prende-se com o facto dos tecidos internos dos rins não se encontrarem encapsulados no interior deste órgão, mas sim localizados próximos das veias junto à parte anterior dos rins [59]. A tiróide também não se encontra encapsulada em tecido conjuntivo formando um órgão; ao invés disso é um agregado de folículos distribuído entre as guelras e o coração. Contrariamente ao ser humano, não apresenta glândulas paratiroides, sendo as guelras as responsáveis pela produção da hormona paratiroideia [51]. As gónadas possuem diferenças estruturais, mas as funções gerais são semelhantes às do Homem [59].

Possuem escamas e não apresentam estruturas como as glândulas sebáceas [51].

A Figura 3.1 representa alguns dos principais órgãos do peixe-zebra.

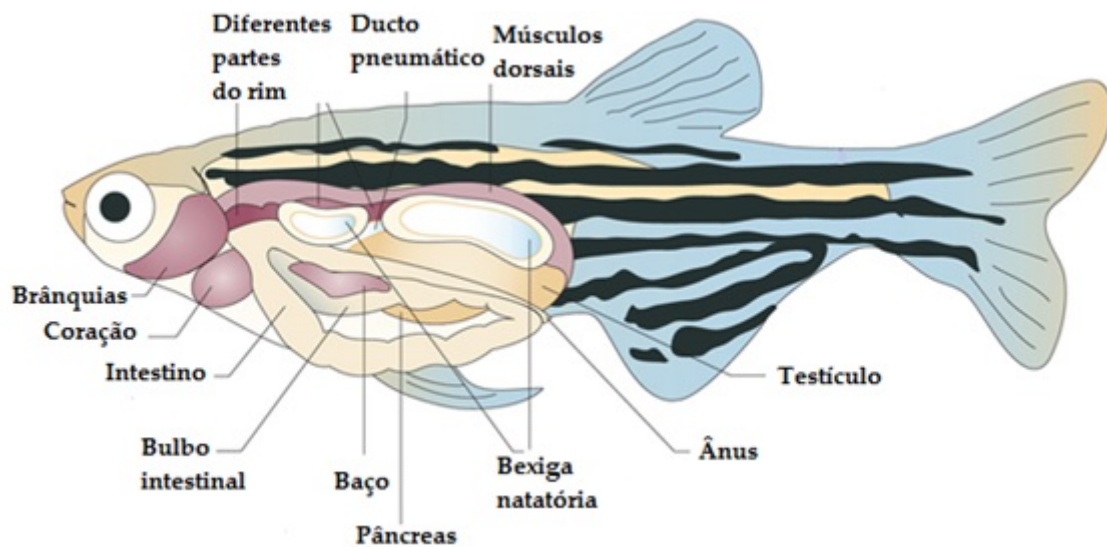


Figura 3.1: Figura representativa dos principais órgãos do peixe-zebra (adaptado de [58])

TÉCNICAS E PRINCÍPIOS FÍSICOS

4.1 Raios-X

Os raios-X são uma forma de radiação eletromagnética cujo comprimento de onda varia entre os 0.005 e os 10 nm. Devido à sua alta energia, têm a capacidade de ionizar matéria e de produzir danos biológicos. Quando uma fonte composta por partículas carregadas (regra geral elétrons, partículas alfa ou prótons) irradia um conjunto de átomos, ocorre uma desaceleração dessas mesmas partículas devido às forças de Coulomb e devido à capacidade de ionizar os átomos do alvo, irão ocorrer também transições eletrônicas nas diversas camadas dos mesmos. Ocorre assim a emissão de raios-X, com um espectro de energia caracterizado por uma componente contínua e outra discreta. A desaceleração das partículas causa uma perda de energia das partículas incidentes, ocorrendo uma emissão com espectro de energia contínuo de raios-X. A esta radiação dá-se o nome de *Bremsstrahlung*.

As transições eletrônicas no átomo irradiado ocorrem quando a energia das partículas incidentes é suficiente para ejetar um elétron de uma das camadas mais interiores, gerando uma lacuna nessa mesma camada. De uma forma simplificada, caso o elétron tenha sido removido da camada K e a lacuna preenchida por um elétron proveniente da camada L, ocorre a emissão de uma linha de raio-X específica do elemento bombardeado, denominada $K\alpha$; caso a lacuna seja preenchida por um elétron da camada M, dá-se a emissão da linha $K\beta$ [60]. Estas linhas representam a componente discreta no espectro de emissão. A esta radiação emitida dá-se o nome de fluorescência [61]. Na Figura 4.1 encontram-se representadas as transições possíveis dos elétrons de um átomo.

Todavia, as transições eletrônicas não têm necessariamente que ser seguidas pela emissão de um fóton, pode também ocorrer autoionização. Aquando do preenchimento da lacuna inicial por um elétron de uma camada superior, um outro elétron de uma camada

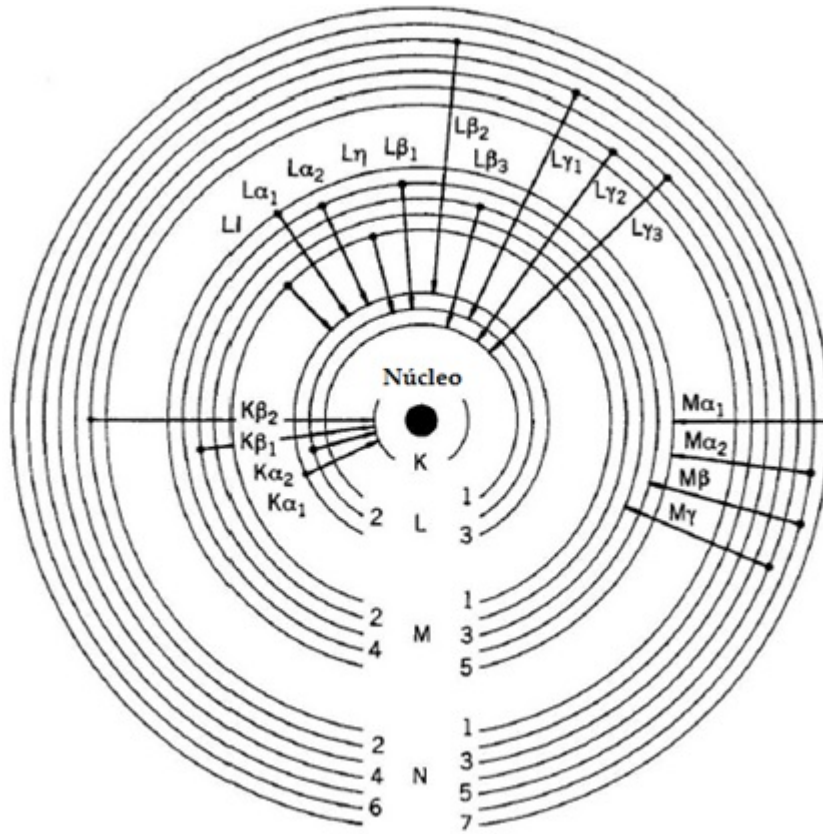


Figura 4.1: Representação de possíveis transições eletrônicas (adaptado de [62])

exterior poderá ser ejetado, levando o excesso de energia. Este efeito é denominado efeito de Auger [63].

4.2 Interação de radiação com a matéria

Os fótons (raios-X) produzidos numa determinada fonte como tubos, material radioativo, sincrotrões, etc, podem penetrar na matéria (no caso desta dissertação, a matéria será o peixe-zebra) e ter diversos comportamentos com diferentes probabilidades: não interagirem com esta, interagirem e serem completamente absorvidos, interagirem e sofrerem dispersão com ou sem perda da sua energia. Desta forma, na região da energia em que será efetuado o estudo, os principais processos que representam a interação de fótons com a matéria são o efeito fotoelétrico, a dispersão de Rayleigh e o efeito de Compton.

Quando um feixe de fótons monoenergéticos atinge a matéria, este é atenuado, sendo o número de fótons transmitidos dado pela lei de Lambert-Beer (Equação 4.1).

$$N = N_0 \cdot e^{-\mu(E,Z,\rho)}, \quad (4.1)$$

onde,

N é o número de fótons transmitido;

N_0 é o número de fótons incidentes;

$\mu(E, Z, \rho)$ é o coeficiente de atenuação linear, dado em função da energia do fóton incidente E , do número atômico Z do material e da sua densidade ρ ;

d é a grossura do material.

O μ tem em conta a contribuição para a atenuação de cada um dos processos de interação, contribuições estas que são muitas vezes expressas em relação às suas secções eficazes. Resulta assim a relação expressa na Equação 4.2 [64]:

$$\frac{\mu}{\rho} = \sigma_{total} \frac{N_A}{A}, \quad (4.2)$$

onde,

ρ é a densidade do material;

σ_{total} é a secção eficaz total;

N_A é o número de Avogadro (6.022137×10^{23} átomos/mol);

A é a massa atômica relativa (g/mol).

4.3 Efeito fotoelétrico

Este efeito ocorre quando um fóton interage com um eletrão ligado de um átomo. O fóton é absorvido e o eletrão da camada (K, L ou M, no caso de se tratar essencialmente de radiação-X) é ejetado com uma determinada energia cinética igual à diferença entre a energia do fóton incidente e a energia de ligação do eletrão, causando assim a ionização do átomo. A lacuna gerada pode então ser preenchida por um eletrão de uma camada mais exterior através de uma transição denominada radiativa, resultando na emissão de um raio-X [65]. Pode também ocorrer uma transição não radiativa culminando com a ejeção de um eletrão de Auger [61].

Regra geral, a probabilidade de ocorrência do efeito fotoelétrico é superior para baixas energias dos fótons incidentes e para um maior número atômico Z do material em questão [65].

A Figura 4.2 ilustra o efeito fotoelétrico.

4.4 Dispersão de Rayleigh

Este fenómeno ocorre quando os fótons incidem sobre um átomo e são dispersos devido aos eletrões fortemente ligados, ocorrendo uma oscilação da nuvem eletrónica graças ao campo elétrico dos fótons incidentes [67]. Após a interação, esses eletrões continuam no seu estado inicial, não se tratando assim nem de uma excitação nem de uma ionização.

Como o efeito desta interação é sentido pelo átomo por inteiro, esta trata-se de uma dispersão coerente. É considerada uma dispersão elástica pois não há perdas significativas de energia.

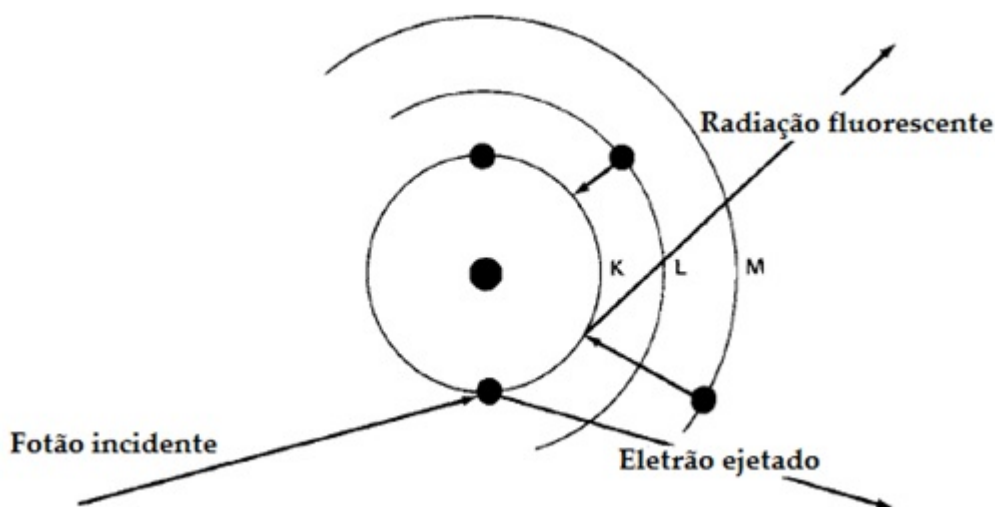


Figura 4.2: Esquema representativo do Efeito fotoelétrico (adaptado de [66])

Este efeito não é significativo em tecidos biológicos uma vez que para elementos leves, como os que compõem maioritariamente estes tecidos, o efeito de Compton é predominante [68]. Este fenómeno é mais relevante para baixas energias dos fótons incidentes e para altos valores de número atômico do material [65].

4.5 Efeito de Compton

Este efeito representa uma dispersão incoerente e inelástica, em que um fóton colide com um eletrão de uma camada exterior do átomo e com baixa energia de ligação. Do ponto de vista do fóton incidente, este eletrão tem energia cinética e momento iniciais quase nulos [65].

Ao colidirem, o fóton cede parte da sua energia e é disperso com um ângulo diferente do inicial [61]; devido à fraca energia de ligação do eletrão da camada exterior, este será então ejetado, deixando assim o átomo ionizado.

Este efeito é mais provável para energias elevadas dos fótons incidentes e para materiais com menor número atômico [65].

A Figura 4.3 ilustra o Efeito de Compton.

4.6 Fluorescência de Raios-X

A **Fluorescência de Raios-X (XRF)** tem por base a ionização de um átomo através do efeito fotoelétrico e consequente emissão de raios-X que posteriormente será detetada num sistema apropriado para o efeito. Esta técnica permite identificar e quantificar os componentes de uma amostra através do espectro de emissão obtido, com picos característicos de cada elemento.

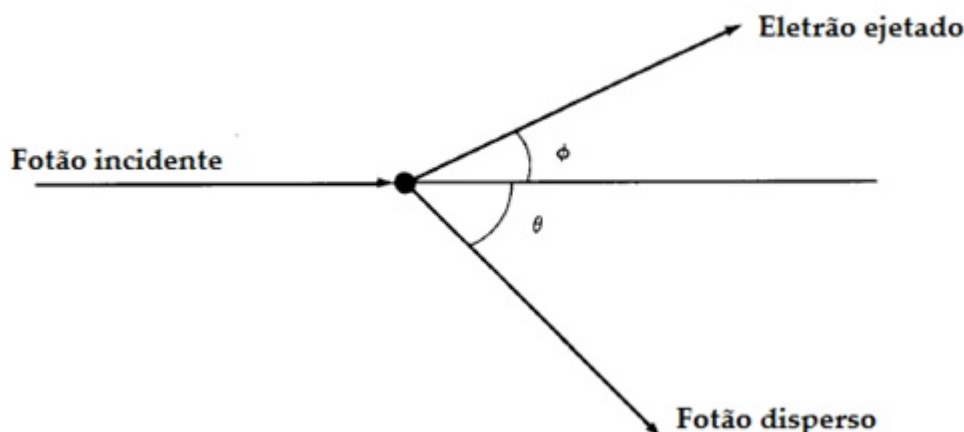


Figura 4.3: Esquema representativo do Efeito de Compton (adaptado de [66])

Devido ao efeito de Auger, muitas vezes o número de raios-X produzidos após a interação com um átomo é inferior ao número de lacunas criado. À razão entre o número total de raios-X característicos provenientes de uma camada (emitidos por uma amostra) e o número de lacunas nessa mesma camada dá-se o nome de rendimento de fluorescência; este rendimento depende do número atômico do elemento, sendo bastante baixa para elementos leves [69].

Dos efeitos resultantes da interação com a matéria acima descritos, o mais relevante para a XRF é o efeito fotoelétrico (entre os 10 e os 150 keV), uma vez que radiação dispersa pelo alvo, através dos restantes efeitos, não facultam informação muito relevante para a determinação dos elementos presentes numa amostra [61].

Esta técnica possibilita a detecção simultânea de vários elementos em baixas concentrações, tornando-se uma boa ferramenta para analisar o conteúdo de elementos traço num dado tecido biológico [8].

Existem várias configurações de XRF, nomeadamente a Fluorescência de Raios-X por Dispersão por Comprimento de Onda (WDXRF) e a Fluorescência de Raios-X por Dispersão em Energia (EDXRF). Dentro da última podem existir variantes que normalmente se relacionam com o uso de alvos secundários ou lentes de raios-X.

4.6.1 Fluorescência de Raios-X por Dispersão em Energia (EDXRF)

Na técnica de EDXRF, a amostra é irradiada por raios-X e a radiação fluorescente por esta emitida interage com o detetor, sendo que todos os fótons com todas as energias da radiação secundária são detetados simultaneamente, usualmente por detetores de estado sólido.

Para a técnica de EDXRF, são necessários: um espectrómetro composto por uma fonte de raios-X, um suporte para a amostra e um detetor [69]. Após a amostra ser excitada, os raios-X característicos emitidos produzem pulsos de carga no detetor, cujas áreas são

proporcionais às energias dos respectivos raios-X. O número de raios-X emitidos por unidade de tempo é designada intensidade e, em primeira aproximação, corresponde à concentração dos diferentes elementos da amostra [70] [61] [69].

É necessário um dado período de tempo, denominado tempo morto, para processar cada pulso, período este durante o qual não é possível a deteção de outro pulso. O tempo morto total aumenta com o incremento da intensidade da radiação, ou seja, quando mais intensa esta for, maiores serão as perdas ocorridas [70].

Para efetuar uma análise correta, é no mínimo necessário entre 0.1 e 2 g de amostra, sendo a quantidade mínima detetável de cada elemento entre 10^{-6} e 10^{-9} g para esta quantidade de amostra. Devido ao efeito Auger bem como à atenuação nos vários elementos do espectrómetro dos raios-X de baixa energia provenientes dos elementos leves, esta técnica é mais precisa para elementos com maior número atómico [12].

As principais vantagens desta técnica são a deteção simultânea de vários elementos, a facilidade e rapidez na preparação da amostra e o facto de possibilitar uma análise não-destrutiva da amostra. Para além disto, o seu equipamento é barato quando comparado, por exemplo, com o da WDXRF [12] [71] e tem-se vindo a trabalhar para melhorar a sua portabilidade [72].

Todavia, esta técnica também possui desvantagens, tais como a reduzida capacidade de deteção de elementos com Z inferior a 13 e não efetuar uma distinção entre diferentes espécies do mesmo elemento, como por exemplo As-III e As-V. Para além disto, possui uma resolução pior comparativamente com outras técnicas, como a WDXRF [73]. Neste trabalho irão ser utilizadas duas técnicas de EDXRF: a μ -EDXRF e a EDXRF com geometria triaxial.

4.6.1.1 μ -EDXRF

A μ -EDXRF baseia-se nos princípios acima descritos, possuindo ainda um policapilar com o intuito de focar o feixe de raios-X, tal como se pode observar Figura 4.4.

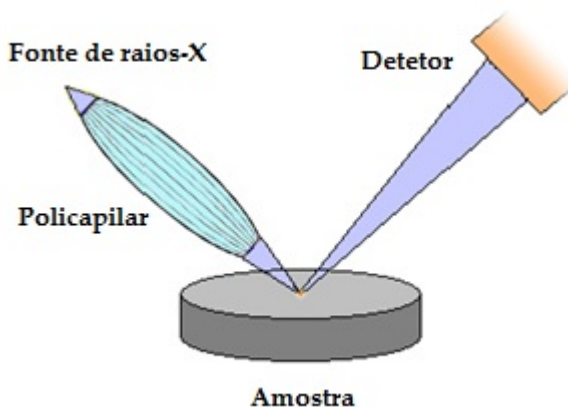


Figura 4.4: Representação da geometria da μ -EDXRF (adaptado de [74])

Através do recurso a este policapilar obtém-se um feixe micrométrico de raios-X que permite efetuar varrimentos a duas dimensões com maior resolução espacial, possibilitando uma melhor análise de amostras heterogêneas [75]. Esta técnica permite ainda a obtenção de mapas de distribuição elementar nas amostras (Figura 4.5), facultando-nos informação necessária para estudar a deposição do arsénio nos vários órgãos do peixe-zebra.

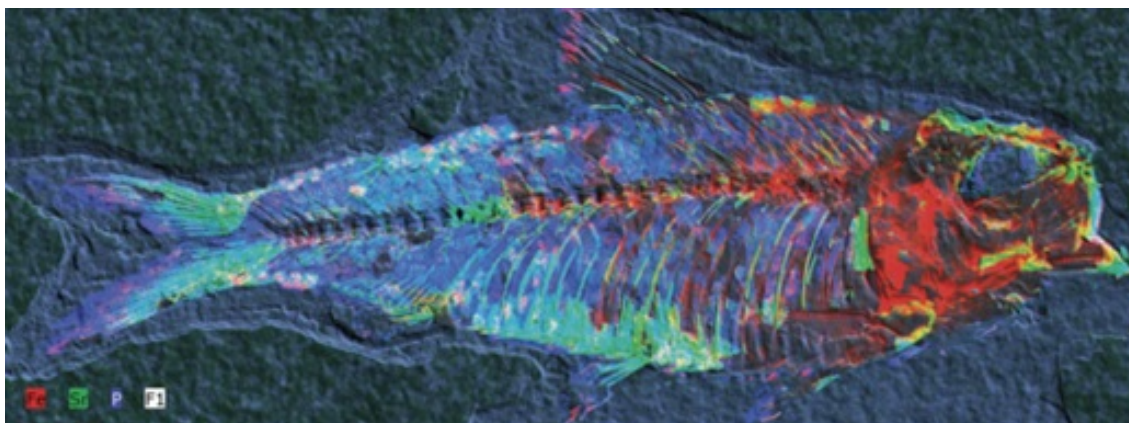


Figura 4.5: Mapeamento de um fóssil de um peixe de água doce [76]

4.6.1.2 EDXRF com geometria triaxial

Na EDXRF com geometria triaxial (Figura 4.6) há a formação de três eixos perpendiculares entre as direções dos raios-X emitidos pela amostra, alvo secundário e fonte de raios-X. Com esta configuração, os raios-X provenientes da fonte incidem no alvo secundário (polarizador) e interagem com este. Depois de incidir no alvo secundário, o feixe é emitido/disperso para todas as direções, sendo esolhido o ângulo de 90° para minimizar os efeitos de Compton e Rayleigh, uma vez que a secção eficaz para esses efeitos, às energias em que ocorre a experiência, é mínima.

Ocorre assim a polarização da radiação, sendo eliminada a componente do campo eléctrico na direção perpendicular à superfície do polarizador. Desta forma, o feixe secundário irá propagar-se ortogonalmente em relação ao feixe primário [77].

Por forma a eliminar a radiação de *Bremsstrahlung* proveniente da fonte, esta tem que ser dispersa a 90° , pelo que o detetor deve ser colocado perpendicularmente em relação aos feixes primário e secundário.

Esta geometria permite uma redução da radiação de fundo devido à minimização da radiação dispersa por Rayleigh e Compton, uma vez que, no regime de energia utilizado neste trabalho, esta é mínima para 90° , e através da utilização de radiação quase monocromática produzida pelo polarizador [78].

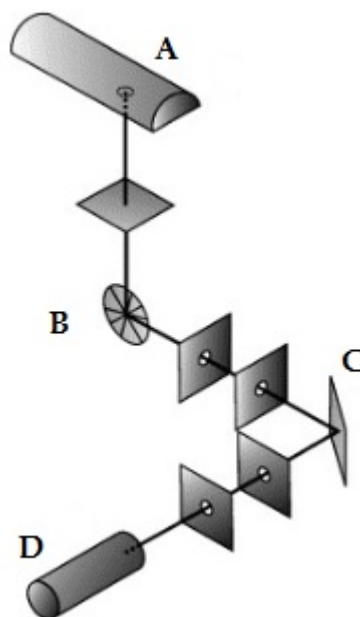


Figura 4.6: Esquema da geometria triaxial. A - tubo de raios-X; B - alvo secundário; C - amostra; D - detector (adaptado de [79])

4.6.1.3 Artefactos espectrais

Os espectros obtidos através da técnica de EDXRF apresentam as linhas características de cada elemento presente na amostra e a radiação de fundo, mas também artefactos resultantes da interação dos raios-X com a amostra ou com o detector. São estes os picos escape, soma e de difração [69].

No caso de o detector ser composto por silício (Si), o pico escape surge quando um raio-X proveniente da amostra com energia superior ao limiar de ionização do Si (1.84 keV) interage com o detector, podendo provocar a emissão de um raio-X com energia característica da $K\alpha$ do Si (1.74 keV). Caso este raio-X seja produzido próximo da superfície do detector, este pode escapar antes de ocorrer a sua reabsorção pelo detector. Desta forma, a energia medida será a do pico original menos 1.74 keV [70] [69].

O pico soma ocorre quando chegam ao detector simultaneamente pelo menos dois raios-X, não sendo possível distingui-los. No espectro surge assim um pico extra, cuja energia corresponde à soma das suas energias [69].

O pico de difração surge quando a amostra possui uma qualquer estrutura cristalina que irá provocar a difração dos raios-X provenientes do tubo, posteriormente coletados pelo detector [80]. A radiação é difratada segundo um determinado ângulo, de acordo com a Lei de Bragg [69].

4.6.1.4 Métodos de quantificação e calibração

Nas técnicas de EDXRF utilizadas (μ -EDXRF e triaxial), por forma a efetuar a quantificação dos diversos elementos químicos presentes na amostra, utilizou-se o método dos

parâmetros fundamentais. Este tem por base parâmetros atômicos, tais como rendimento de fluorescência ou secções eficazes para a absorção e produção de raios-X e relaciona a intensidade de cada pico com a respetiva concentração elementar [81]. Para o elemento i , temos a Equação 4.3 [82].

$$I_i = I_0 \cdot m \cdot C_i \cdot A_i \cdot K_i, \quad (4.3)$$

onde,

I_i é a intensidade medida do pico correspondente ao elemento;

I_0 é a intensidade do feixe de raios-X;

m é a densidade superficial da amostra (g cm^{-2});

C_i é a concentração do elemento ($\mu\text{g g}^{-1}$);

A_i é o fator de atenuação, relacionado com a matriz da amostra;

K_i é o fator de calibração experimental.

Uma vez que as amostras a serem analisadas são biológicas, estas são maioritariamente constituídas por elementos leves, tais como hidrogénio, oxigénio ou carbono, não sendo possível detetá-los por EDXRF devido ao seu baixo número atômico. Por esta razão estima-se a sua concentração através da utilização de amostras padrão, servindo de calibração e permitindo encontrar os valores para K_i e A_i [81] [82]. Com todos os parâmetros para matrizes leves estimados teoricamente, e com a calibração do espectrómetro previamente efectuada, ficamos apenas com uma relação linear entre a intensidade do pico e a concentração do elemento i .

4.6.1.5 Limites de deteção

O **Limite de Deteção (DL)** representa a concentração mínima necessária de um dado elemento na amostra por forma a possibilitar a sua análise [69]. No caso da EDXRF, pode ser calculado para cada elemento de acordo com a Equação 4.4 [81].

$$DL = \frac{3C_i\sqrt{N_b}}{N_p}, \quad (4.4)$$

onde,

C_i é a concentração do elemento a ser analisado;

N_b é o número de contagens do fundo;

N_p é o número de contagens do pico correspondente a esse elemento.

O valor de N_p foi calculado para o As em amostras padrão, cuja matriz emula a do peixe zebra de modo a mais tarde podermos avaliar os resultados à luz deste valor.

4.6.1.6 Incertezas associadas

Ambas as técnicas de EDXRF utilizadas possuem uma incerteza associada às suas análises devido a vários tipos de erros de precisão e exatidão.

A precisão está associada ao número de vezes que um dado intervalo de valores se repete. Os erros associados à precisão são estatísticos e podem derivar, por exemplo, de pequenas discrepâncias no processo através do qual se ajustam os picos de intensidade de raios-X.

A exatidão relaciona-se com a semelhança entre um dado resultado e o seu valor real. Os erros de precisão são sistemáticos e podem advir, por exemplo, de calibração inicial inadequada ou de um modelo teórico desajustado [83].

Para determinarmos as incertezas associadas a cada conjunto de medições de uma concentração por EDXRF, é necessário recorrer à equação que nos permite determinar a média ponderada para cada elemento j [84] (Equação 4.5).

$$\bar{X}_p = \frac{1}{\sum_{i=1}^N \mu(X_i)} \times \sum_{i=1}^N \mu(X_i) \times X_i, \quad (4.5)$$

onde,

\bar{X}_p é a média ponderada;

$\mu(X_i)$ é a incerteza da medição em cada ponto da amostra i para o elemento j ;

X_i é a concentração do elemento j na amostra i ;

N é o número de medições que se efetuaram.

Em seguida, é necessário aplicar a Lei da Propagação das Incertezas à equação anterior por forma a ser possível determinar a incerteza associada à média ponderada (Equação 4.6).

$$\mu(\bar{X}_p) = \frac{1}{\sum_{i=1}^N \mu(X_i)} \sqrt{\sum_{i=1}^N \mu(X_i)^4}. \quad (4.6)$$

Para chegarmos à equação final da incerteza, é necessário efetuar a soma quadrática entre o desvio-padrão (σ) e a média ponderada. Por fim, efetua-se a raiz quadrada dessa soma e obtém-se a Equação 4.7.

$$\mu(\bar{X}_f) = \sqrt{(\mu(\bar{X}_p))^2 + \sigma^2}. \quad (4.7)$$

$\mu(X_p)$ é o erro da média ponderada de um conjunto de medições do M4 TornadoTM da Bruker, onde a incerteza de cada medição é $\mu(X_i)$, associado ao erro do fit do fundo efetuado pelo *Software*. Este é um valor bastante pequeno, na ordem dos 10^{-8} $\mu\text{g/g}$, pelo que se considerará que a incerteza será, aproximadamente, o valor do desvio-padrão (σ), cujo valor é várias ordens de grandeza mais elevado.

4.6.2 Espectrometria de Emissão Atômica por Plasma Induzido (ICP-AES)

A ICP-AES é uma técnica que permite efetuar uma análise química de uma amostra. No caso de esta ser sólida, será dissolvida num solvente específico e colocada num nebulizador, onde é transformada em aerossol.

As partículas do aerossol são separadas de acordo com o seu tamanho, sendo as menores transferidas para o plasma de argon a altas temperaturas. Ao entrarem em contacto com o plasma, o solvente evapora, ocorre vaporização das partículas (moléculas) e posterior dissociação em átomos.

Ainda no plasma, ocorre a excitação dos átomos; quando estes regressam ao seu estado de energia inicial, ocorre a emissão de radiação, com energia específica do elemento excitado, cuja intensidade é proporcional à concentração do elemento [85] [86].

As principais vantagens desta técnica são permitir a análise simultânea de múltiplos elementos e ter um limite de deteção na ordem dos $\mu\text{g/L}$, ou seja, cerca de 1000 vezes mais baixo que a EDXRF. Em contrapartida, é dispendiosa devido ao grande consumo de argon, ao facto de ser necessária a preparação das amostras, e não é adequada para elementos voláteis [86].

MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Bioensaios

A parte experimental desta dissertação teve início com a exposição dos peixes-zebra a diferentes concentrações de arsénio, realizada no Biotério do Departamento de Ciências e Engenharia do Ambiente da FCT-UNL.

Os peixes-zebra utilizados nesta experiência foram importados da Ásia, são adultos e de ambos os sexos. Têm um comprimento médio de 29 mm ($\sigma = 4$) e um peso húmido médio de 400 mg ($\sigma = 120$).

Todos os ensaios tiveram a duração de sete dias e foram semi-estáticos, tendo o meio sido renovado a cada 24h. Todos decorreram sob as mesmas condições, nomeadamente pH de 7.1 ± 0.5 e temperatura de $20 \pm 1^\circ\text{C}$. Os peixes foram alimentados diariamente com flocos comerciais (Eco Vita).

Em cada ensaio, 9 peixes foram distribuídos aleatoriamente por 3 tanques, cada um com volume de 4 litros, formando três grupos:

- **Grupo A** - Peixes expostos a uma maior concentração de As ($300 \mu\text{g/L} = 300 \text{ ppb}$);
- **Grupo B** - Peixes expostos a uma menor concentração de As ($150 \mu\text{g/L} = 150 \text{ ppb}$);
- **Grupo C** - Peixes não expostos a arsénio (controlo).

As figuras seguintes mostram os tanques utilizados e dois dos peixes utilizados neste estudo:

Aos grupos A e B foram adicionadas diferentes concentrações de arsenito, um sal que contém As-III. As soluções Stock de arsenito foram preparadas a partir de um As-III padrão (Sigma-Aldrich, Alemanha), por adição de água destilada a uma concentração



Figura 5.1: Tanques correspondentes aos grupos A, B e C



Figura 5.2: Peixes-zebra

final de 100 mg/L. Foram então retiradas diferentes alíquotas para cada tanque (A e B), dependendo da concentração de arsenito desejada.

Para determinar o valor dessas concentrações tivemos como referência o LC_{50} do arsénio, que nos indica a concentração a partir da qual metade da população da amostra exposta morre. Este valor é determinado experimentalmente e depende do organismo em questão, do tempo de exposição e das várias condições em que o ensaio decorre, nomeadamente a temperatura, pH e dureza da água. De acordo com Bhavani et al., o LC_{50} (mg/L) do As-III para 24h é 21.88, para 48h é 16.21, para 72h é 10.96 e para 96h é 8.91 [87].

Após o término de cada bioensaio, procedeu-se à eutanásia dos peixes através de choque térmico a -80°C , segundo as normas internacionais de bem-estar animal [88].

Por forma a otimizar o procedimento experimental e encontrar as concentrações ideais a utilizar neste estudo, realizaram-se vários ensaios preliminares.

5.1.1 Primeiro bioensaio

Neste ensaio submeteram-se os peixes do Grupo A a uma concentração de 300 ppb e os do Grupo B a uma concentração de 150 ppb. Dos 9 peixes utilizados neste ensaio, dois

Tabela 5.1: Dados dos indivíduos do 1º bioensaio

Grupo	Indivíduo	Sexo (Macho = M; Fêmea = F)	Comprimento (mm \pm 0.05 mm)	Peso húmido (mg \pm 0.1 mg)	Peso seco (mg \pm 0.1 mg)
Grupo A	A1	F	35.00	626.0	187.0
	A2	F	33.00	450.0	65.0
Grupo B	B1	F	23.00	210.0	18.0
	B2	F	31.00	483.0	61.0
Grupo C	C1	M	25.00	268.0	31.0
	C2	F	31.00	591.0	127.0

Tabela 5.2: Dados dos indivíduos do 2º bioensaio

Grupo	Indivíduo	Sexo (Macho = M; Fêmea = F)	Comprimento (mm \pm 0.05 mm)	Peso húmido (mg \pm 0.1 mg)	Peso seco (mg \pm 0.1 mg)
Grupo A	A1	M	30.00	442.8	46.0
	A2	M	22.00	271.7	18.0
	A3	F	24.00	322.3	47.0
Grupo B	B1	M	24.00	278.2	25.0
	B2	F	32.00	432.5	48.0
	B3	F	29.00	555.2	75.0
Grupo C	C1	F	34.00	459.0	65.0
	C2	F	26.00	288.1	39.0
	C3	F	29.00	440.0	63.0

peixes não sobreviveram, um deles do Grupo A e outro do Grupo B, tendo assim uma taxa de mortalidade de, aproximadamente, 22%.

Na Tabela 5.1 encontram-se os dados relativos aos indivíduos de cada grupo.

5.1.2 Segundo bioensaio

Neste ensaio final, submeteram-se os peixes às mesmas condições que no ensaio anterior, por forma a corroborar os resultados obtidos. Contrariamente ao sucedido no ensaio anterior, a taxa de mortalidade verificada foi nula.

A Tabela 5.2 contém os dados referentes aos indivíduos de cada grupo:

5.1.3 Bioensaio para estudo enzimático

Este ensaio foi realizado nas mesmas condições que os anteriores, tendo-se distribuído aleatoriamente 9 peixes pelos 3 tanques, formando 3 grupos (Grupo A – 300 ppb de arsenito; Grupo B - 150 ppb de arsenito; Grupo C - controlo).

A taxa de mortalidade neste ensaio foi nula e os peixes foram apenas utilizados para se proceder ao estudo enzimático.

5.2 Preparação das amostras

5.2.1 Amostras para EDXRF e ICP-AES

Após o término de cada dos Bioensaios 1 e 2, cada peixe foi ultracongelado a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ e posteriormente cortado transversalmente com uma lâmina de barbear, sendo que cada metade foi considerada uma amostra.

Em seguida, as amostras foram liofilizadas durante 48h e posteriormente colocadas em slides (Figura 5.3). Em cada um destes foi colocada uma folha de mylar, à qual se adicionou um pouco de cola UHU®, cuja composição é livre de qualquer elemento que consigamos detectar por EDXRF, por forma permitir a adesão do peixe à folha.



Figura 5.3: Montagem de uma amostra num slide

Após a preparação das amostras, efetuaram-se as análises por μ -EDXRF e EDXRF com geometria triaxial no Laboratório de Física Atómica e Molecular do Departamento de Física da FCT-UNL. Finalmente, as amostras foram submetidas à técnica de ICP-AES no Departamento de Química.

5.2.2 Amostras para estudo enzimático

Após o término do Bioensaio para estudo enzimático, eutanasiaram-se os peixes. Em seguida procedeu-se ao tratamento das amostras, no qual estas foram homogeneizadas em 2 mL de solução tampão PBS (salino) a pH 7.4 através do recurso a um homogeneizador (T10 Basic Ultra Turrax®, Ika, Alemanha). Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 4°C durante 10 minutos e posteriormente congeladas a -80°C . Para efetuar o estudo enzimático, recorreu-se ao uso de microplacas de 96 poços.

5.3 Análise por EDXRF

5.3.1 μ -EDXRF

A primeira técnica a ser utilizada foi a μ -EDXRF através do espectrómetro M4 TornadoTM da Bruker (Figura 5.4). Este aparelho é composto por um tubo de raios-X com um ânodo de ródio, alimentado por um gerador de baixa potência e alta tensão (máximo 50 kV e 600 μ A), arrefecido a ar, e por uma câmara de vácuo. Possui um policapilar que permite obter um feixe de raios-X com cerca de 25 μ m. O detetor é de deriva de silício (SDD), possuindo uma resolução em energia de 142 eV para a linha $K\alpha$ do manganês e uma área ativa de 30 mm² [89]. Através desta técnica obtivemos o mapeamento elementar dos vários peixes-zebra, assim como a distribuição da concentração de diversos elementos nos vários tecidos.

As análises e mapeamentos foram efetuados em vácuo primário, com uma pressão de 20 mbar, uma tensão do tubo de 50 kV e uma corrente de 600 μ A. Recorreu-se a um filtro composto por 100 μ m de Al, 50 μ m de Ti e 25 μ m de Cu, entre o tubo e a amostra. Em média, cada aquisição demorou cerca de 2h.



Figura 5.4: Espectrómetro M4 TornadoTM, Bruker

Por forma a determinar o DL de arsénio, efetuou-se a análise por μ -EDXRF de várias amostras-padrão contendo diversas concentrações de arsénio: *Bush Branches*, *Fish Flesh*, *Orchard Leaves* e *Oyster Tissue* (Apêndice A).

Destas amostras, a que apresenta maior concentração de As é a *Orchard Leaves* (NBS-1571), com 14 mg/g. Através deste valor e da equação anteriormente indicada 4.4, obteve-se um DL para o As de aproximadamente 4.45 mg/g.

5.3.2 EDXRF com geometria triaxial

A segunda técnica utilizada foi a EDXRF com geometria triaxial, composta por um tubo de raios-X com um ânodo de tungsténio e um alvo secundário de molibdénio, colocado a um ângulo de 90° em relação à amostra. Devido a esta polarização é possível obter um feixe aproximadamente monocromático de 17.44 keV e 19.60 keV. Assim como na

μ -EDXRF, o detetor também é um semicondutor de silício, embora seja do tipo Si(Li) e possui uma área ativa de 30 mm², possuindo ainda uma janela de berílio com 8 μ m [79].

As análises foram efetuadas com uma tensão de 50 kV e uma corrente 20 mA, valores para os quais o *Software* está otimizado. Para esta técnica considerou-se um valor de DL para o As de 4.45 mg/g, semelhante ao da técnica anterior.

5.4 Análise por ICP-AES

A terceira técnica utilizada foi a ICP-AES e as amostras foram analisadas no Departamento de Química da FCT-UNL. Esta foi utilizada com o intuito de validar os resultados obtidos pelas técnicas de EDXRF.

O espectrómetro utilizado é do modelo Ultima, da Horiba-Jobin. As amostras foram analisadas após terem sido digeridas com HNO₃ e H₂O₂ (Sigma-Aldrich, USA), de acordo com os métodos US EPA (Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos). Este espectrómetro permite a análise de elementos químicos cujas bandas do espectro de emissão se encontrem entre os 180 nm e os 800 nm, possui um limite de deteção na ordem dos ppb e permite analisar simultaneamente até 73 elementos em cada amostra [90].

5.5 Estudo Enzimático

Após a preparação das amostras acima descrita, procedeu-se ao estudo de vários biomarcadores (LPO, GST, GPX, SOD, CAT e Ub). A quantidade total de proteína em cada amostra foi determinada através do método de Bradford [91], tendo os resultados dos biomarcadores sido normalizados, dividindo-se o valor final de cada amostra pela quantidade total de proteínas respetiva.

5.5.1 Peroxidação Lipídica (LPO)

A LPO foi determinada de acordo com os protocolos de Ohkawa *et al.* [92] e através da medição das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARs). A absorvância de cada amostra foi lida a 530 nm. Por fim, com o intuito de se quantificar as amostras, elaborou-se a uma curva de calibração com base em padrões de MDA da Merck (Portugal) [93].

5.5.2 Glutathione S-Transferase (GST)

O ensaio desta enzima foi realizado de acordo com o método de Habig *et al.* [94], adaptado para microplaca.

Efetuuou-se uma mistura reacional por forma a obtermos a solução de substrato, constituída por produtos da Sigma: tampão Dulbecco (fosfato salino), GSH e CDNB (1-cloro-2,4-dinitrobenzeno). Posteriormente efetuou-se a leitura, minuto a minuto, da absorvância a

340nm de cada amostra, durante 6 minutos. Por fim calculou-se a atividade da GST de acordo com o descrito por Madeira *et al.* [95].

5.5.3 Peroxidase de Glutathione (GPX)

Para determinar a atividade da GPX mediu-se o consumo de β -NADPH como reagente numa reação secundária catalisada pela Glutathione Redutase, de acordo com o protocolo descrito por Lawrence e Burk [96], adaptado para microplaca.

Para tal, utilizou-se tampão fosfato com EDTA e uma solução de co-substratos composta por β -NADPH, GSH e glutathione redutase.

Por fim, mediu-se a absorvância das amostras a 340 nm, a cada minuto, durante 6 min.

5.5.4 Superóxido Dismutase (SOD)

Neste ensaio seguiu-se o protocolo descrito por McCord e Fridovich [97] e adaptado para microplaca. Utilizaram-se como reagentes tampão fosfato de potássio, EDTA, solução de Xantine, solução contendo Citocromo C (bovino), Oxidase de Xantine (XOD). A absorvância foi lida a 550 nm durante 5min e os resultados expressos em termos de percentagem de inibição de SOD.

5.5.5 Catalase (CAT)

Este ensaio foi efetuado com base nos protocolos de Johansson e Borg [98], adaptados para microplaca, tendo a absorvância sido medida a 540 nm. Por forma a calcular a atividade da CAT, criou-se uma reta de calibração obtida através dos valores de absorvância de padrões de formaldeído, considerando que cada unidade de CAT corresponde à formação de 1 nmol de formaldeído/min (a 25°C).

5.5.6 Ubiquitinas (Ub)

Para este ensaio recorreu-se ao protocolo de Madeira *et al.* [99], adaptado para microplaca. Para quantificar o teor de Ub das amostras procedeu-se a um ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA), no qual se utilizaram padrões de Ub com diferentes concentrações por forma a obter uma reta de calibração. A absorvância foi medida a 450 nm.

5.6 Análise estatística

A análise estatística efetuada foi realizada no *Software* Statistica 8.0 (Statsoft, 2007, Tulsa, OK, EUA). Recorreu-se ao teste U não-paramétrico de Mann-Whitney para determinar as diferenças estatisticamente significativas entre as amostras de peixes dos diferentes grupos (A, B e C), em relação à concentração de As, Cu, Fe e das diferentes enzimas que constituem os biomarcadores.

ANÁLISE E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

6.1 Análise por μ -EDXRF

Recorremos à técnica de μ -EDXRF e ao espectrómetro M4 TornadoTM da Bruker para obtermos de forma simultânea uma análise qualitativa e uma análise quantitativa de cada amostra.

Esta técnica efetua uma análise qualitativa, resultando no mapeamento do peixe-zebra, permitindo-nos compreender não só os tecidos-alvo do arsénio, mas também a distribuição de outros elementos nos vários órgãos deste peixe. As figuras 6.1, 6.2 e 6.3 mostram os mapeamentos de várias amostras de peixes pertencentes a diferentes grupos (A, B e C, respetivamente):

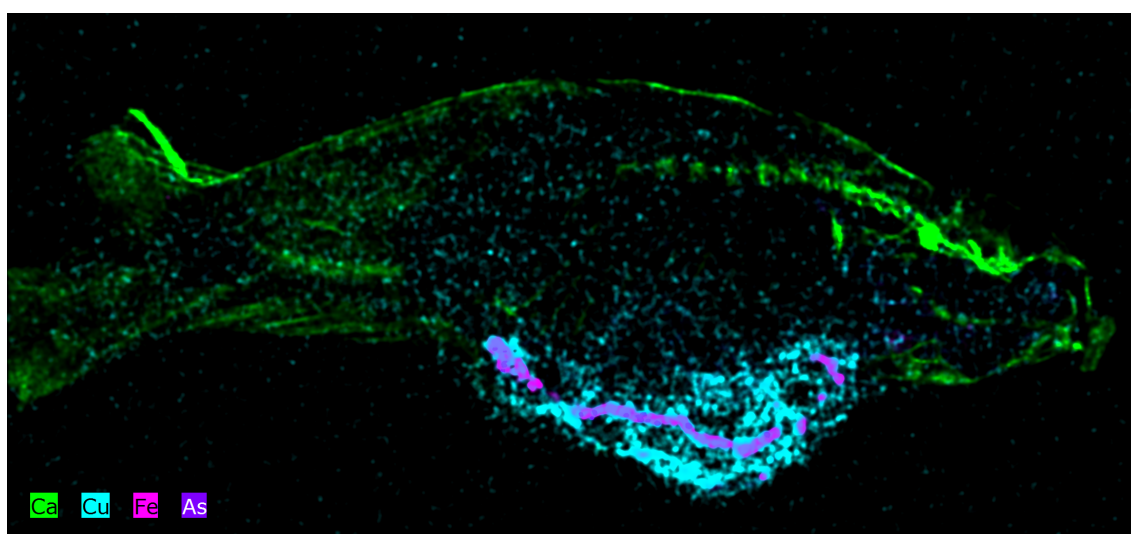


Figura 6.1: Mapeamento de um peixe pertencente ao Grupo A (300 ppb de As)

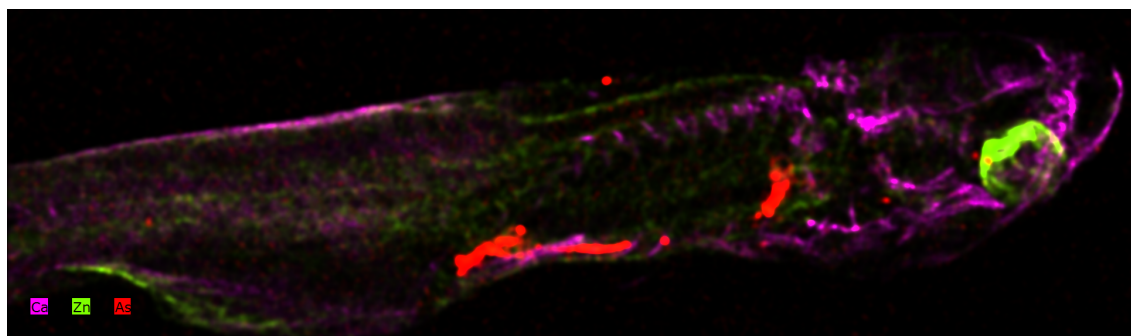


Figura 6.2: Mapeamento de um peixe pertencente ao Grupo B (150 ppb de As)

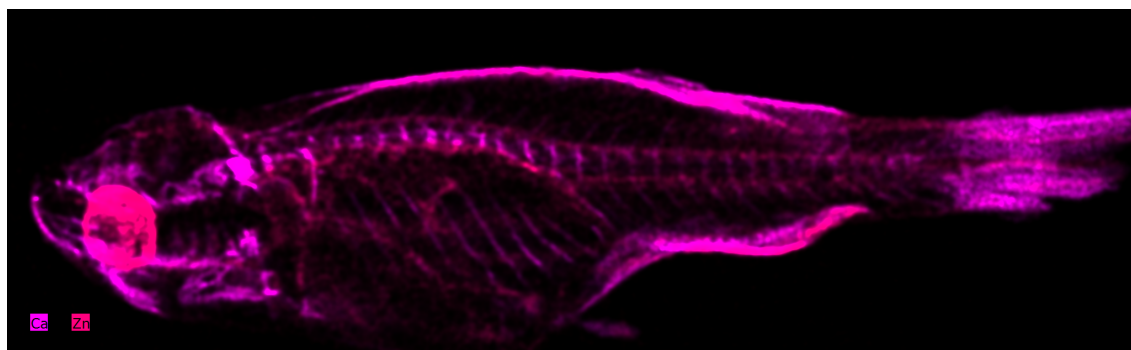


Figura 6.3: Mapeamento de um peixe pertencente ao Grupo C (controle)

Podemos observar que o esqueleto ósseo do peixe-zebra e os seus olhos são constituídos maioritariamente por cálcio (Ca) e zinco (Zn), respetivamente. Pode verificar-se que esta distribuição é independente do grupo a que o peixe pertence.

Em relação ao arsénio, observou-se que este elemento se deposita essencialmente na zona das vísceras, em particular nos intestinos. Esta deposição verificou-se de forma mais acentuada nos peixes do Grupo A (Figura 6.1)

Vários dos peixes analisados ainda apresentavam matéria orgânica na zona dos intestinos, proveniente da sua comida. Nesses mesmos peixes foi possível observar uma grande acumulação de ferro (Fe) e cobre (Cu) nessa mesma área (Figura 6.4)

Em termos de análise quantitativa, efetuaram-se quantificações do peixe por inteiro e de outras áreas/ órgãos: brânquias, cérebro, espinha, intestinos, músculo dorsal e vísceras.

Tendo em conta que vários peixes do Grupo C continham matéria orgânica nos intestinos, com concentrações de Fe e Cu acima de 1000 ppm e 100 ppm, respetivamente, efetuou-se uma quantificação dos flocos alimentícios. Verificou-se que uma pastilha feita destes flocos alimentícios contém, aproximadamente, 600 ppm de Fe e 18 ppm de Cu, o que justifica a grande concentração destes elementos nos intestinos destes peixes. Desta forma, tiveram que ser excluídos todos os controlos do Ensaio 3 e um dos do Ensaio 2, tendo-se utilizado um peixe de um grupo de controlo dos Ensaios Preliminares.

Assim, os resultados apresentados nesta secção, que podem ser consultados no Apêndice A, dizem respeito aos seguintes peixes:

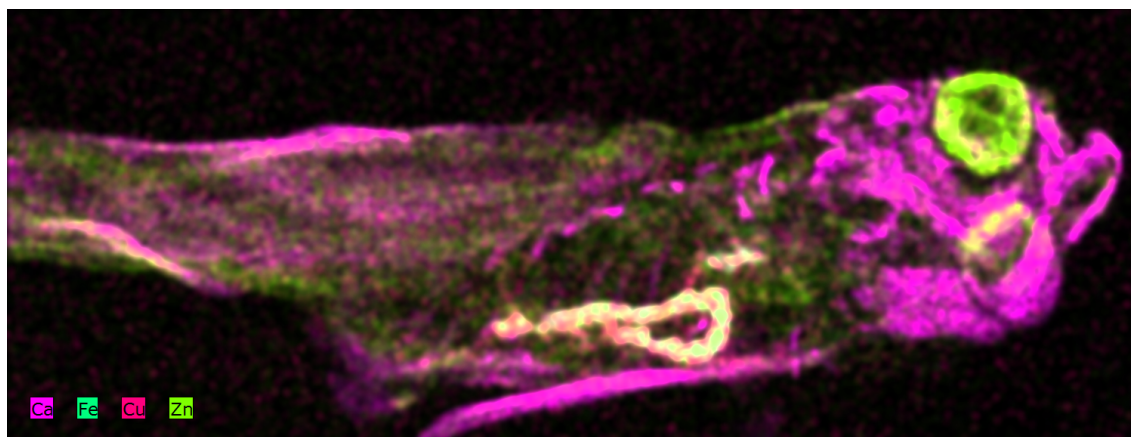


Figura 6.4: Mapeamento de um peixe pertencente ao Grupo C (C2) com comida rica em Fe e Cu nos intestinos

- **Ensaio Preliminares** - C1;
- **Primeiro bioensaio** - A1, A2, B1, B2, C1, C2;
- **Segundo bioensaio** - A1, A2, A3, B1, B2, B3.

No cérebro, espinha e músculo dorsal destes peixes não se observou qualquer conteúdo de As nos peixes dos grupos A, B ou C. No caso das brânquias, os valores encontrados para este elemento são bastante baixos. Tais resultados não significam que não se possa ter bioacumulado As nestas zonas, apenas que essas concentrações poderão estar abaixo do DL (4.45 ppm).

No peixe por inteiro, observou-se uma bioacumulação de arsénio nos peixes pertencentes ao Grupo A, tal como expectável (Figura 6.5).

Tal como observado no mapeamento dos peixes, a área correspondente aos intestinos foi onde se depositou maioritariamente o arsénio, com maior prevalência nos peixes do Grupo A. A área visceral apresentou o mesmo comportamento, ainda que com concentrações menores (Figura 6.6). Para ambas as áreas encontraram-se diferenças estatisticamente significativas ($p < 0.05$) das concentrações entre o Grupo C e A.

Um dos fatores que poderá ter levado à acumulação de As nas vísceras e intestinos poderá estar relacionado com um mecanismo de desintoxicação dos peixes. Este mecanismo é a metilação, que consiste na transformação do As em MMA e DMA, espécies orgânicas mais facilmente excretáveis pelo organismo [26]. Esta metilação ocorre essencialmente nos intestinos e fígado (parte das vísceras) e recorre à metiltransferase As3mt, homóloga da AS3MT encontrada nos humanos [100].

No caso do Fe e do Cu, observou-se que no Grupo C a concentração destes elementos aparenta ser mais homogênea entre as áreas analisadas (Figuras 6.7 e 6.10) e nos Grupos A e B mais heterogênea, podendo observar-se uma tendência decrescente entre intestinos, vísceras, brânquias e as restantes áreas (Figuras 6.8, 6.11, 6.9 e 6.12).

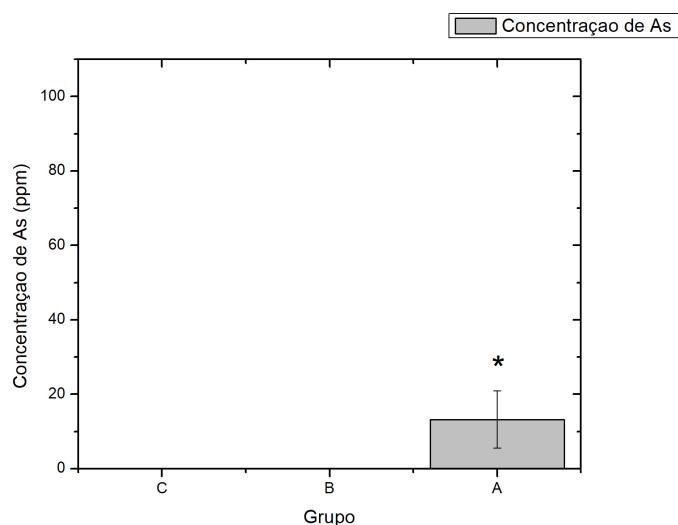


Figura 6.5: Concentração elementar média de arsénio obtida para o peixe por inteiro. Os asteriscos indicam valores estatisticamente significativos ($p < 0.05$) dos grupo expostos em relação ao grupo de controlo

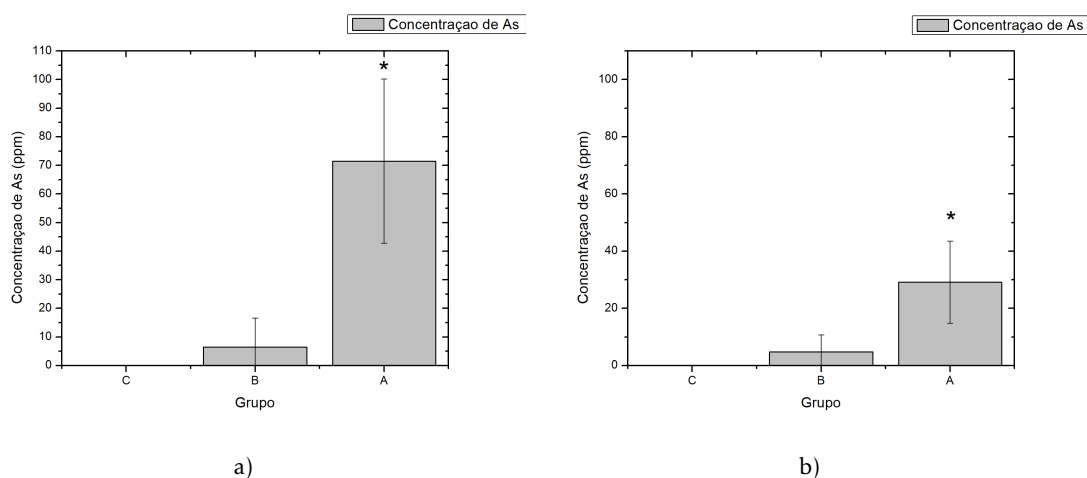


Figura 6.6: Concentração elementar média de arsénio obtida para as áreas correspondentes aos a) intestinos, b) vísceras dos peixes analisados. Os asteriscos indicam valores estatisticamente significativos ($p < 0.05$) dos grupo expostos em relação ao grupo de controlo

Um dos possíveis motivos para que a concentração do Fe e Cu nos intestinos, vísceras, brânquias seja superior em relação às outras áreas à medida que a concentração nominal de As aumenta poderá ser o facto de estes serem os principais órgãos utilizados para expelir agentes tóxicos do organismo. Como o peixe está a tentar metabolizar o As e expeli-lo do organismo, acaba por também metabolizar outros elementos, como é o caso do Fe e Cu, presentes na sua comida.

Existe ainda uma correlação entre as concentrações de Fe e Cu em todos os órgãos do

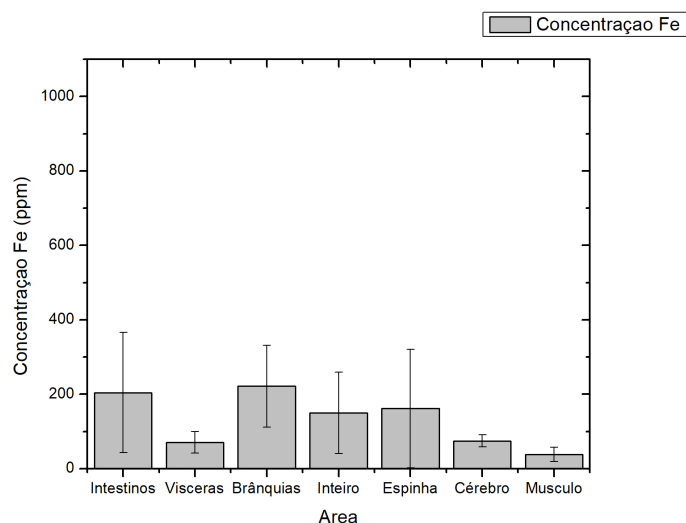


Figura 6.7: Concentração elementar média de ferro nos peixes pertencentes ao Grupo C em cada área analisada

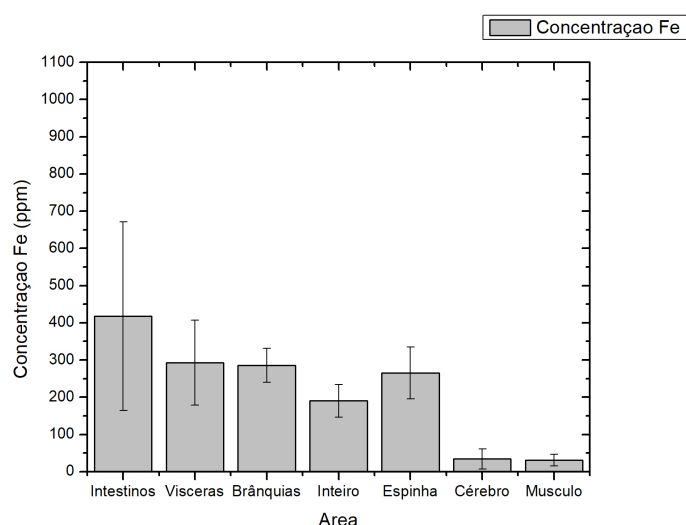


Figura 6.8: Concentração elementar média de ferro nos peixes pertencentes ao Grupo B em cada área analisada

peixe, com $R^2 = 0.59$ (Figura 6.13).

Na Figura 6.13 é possível observar uma relação linear crescente entre os dois elementos, ou seja, à medida que a concentração de Fe aumenta, a de Cu também aumenta.

Um dos fatores que poderá contribuir para a relação entre estes dois elementos é o seu transporte no organismo dos peixes-zebra. Estes peixes possuem uma proteína transportadora de Fe denominada ferroportina, que se encontra na membrana de células epiteliais intestinais responsáveis pela absorção, denominadas enterócitos. A ferroportina apenas atua no transporte do Fe para o exterior da célula na presença da hefaestina, uma oxidase

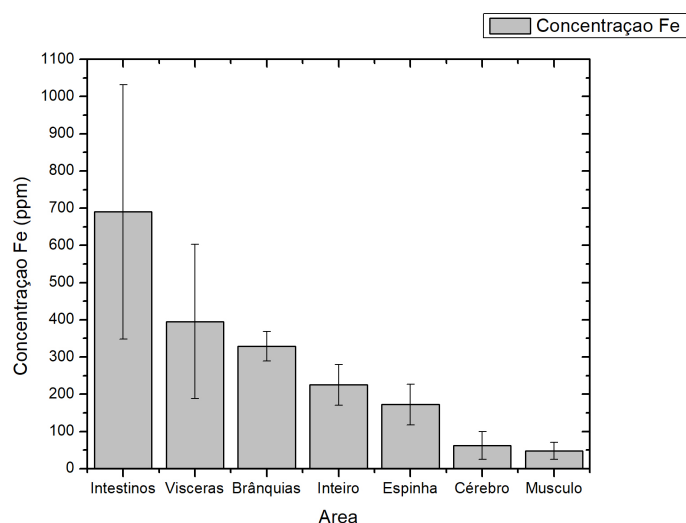


Figura 6.9: Concentração elementar média de ferro nos peixes pertencentes ao Grupo A em cada área analisada

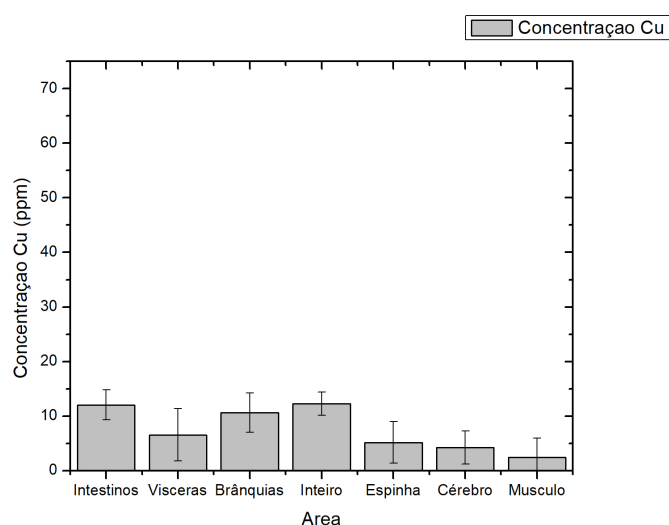


Figura 6.10: Concentração elementar média de cobre nos peixes pertencentes ao Grupo C em cada área analisada

de Cu, que também oxida o Fe, transformando o Fe^{2+} em Fe^{3+} , que se liga à transferina presente no sangue, permitindo que o Fe^{3+} chegue a outras partes do organismo [101].

Verificaram-se ainda possíveis correlações do As com estes elementos (Figura 6.14). Podemos verificar que existe uma correlação significativa entre o Cu e o As, mas tal não se observou entre o Fe e o As. No entanto, dado que muitas das amostras continham uma concentração de As abaixo do limite de deteção, não sabemos se essa correlação é mais alta. Efetuou-se ainda um estudo estatístico para determinar alterações relevantes da concentração de Fe e Cu em relação a cada grupo e não foram encontradas diferenças

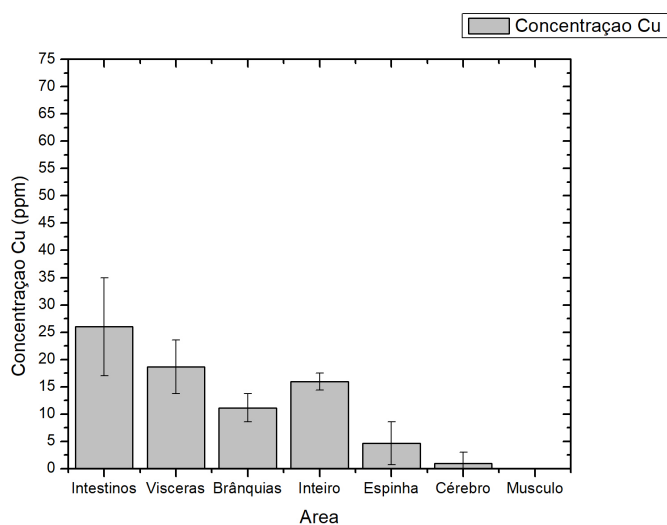


Figura 6.11: Concentração elementar média de cobre nos peixes pertencentes ao Grupo B em cada área analisada

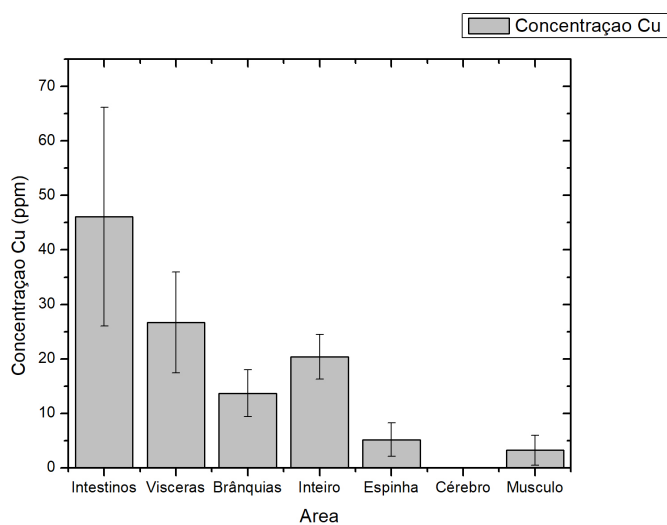


Figura 6.12: Concentração elementar média de cobre nos peixes pertencentes ao Grupo A em cada área analisada

significativas ($p > 0.05$).

Não se encontraram na literatura estudos realizados em peixes nos quais tenha sido estudada a correlação entre o As e o Cu. No entanto, já foi verificada uma relação entre estes elementos em outras espécies. Já se observou uma acumulação de Cu em rins e cérebro de ratos e porquinhos-da-índia após administração oral de arsénio inorgânico. No entanto, os mecanismos químicos envolvidos na interação As-Cu ainda são desconhecidos [102] [103] [104].

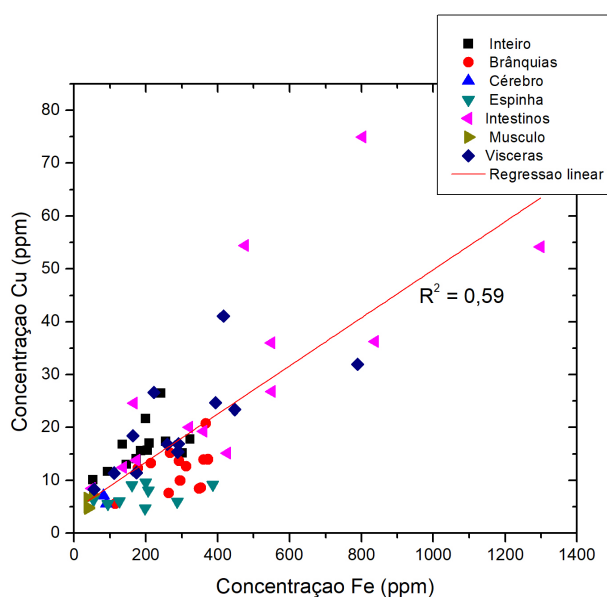


Figura 6.13: Relação entre a concentração elementar média de ferro e cobre em todos os peixes analisados

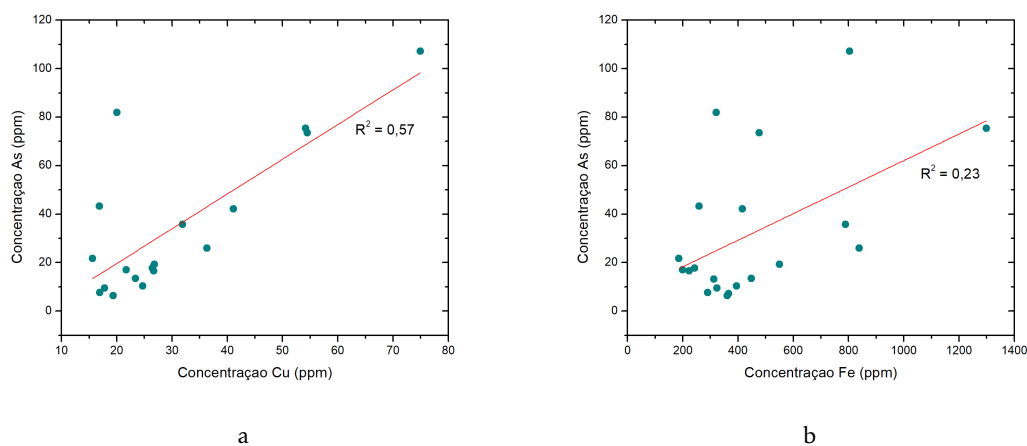


Figura 6.14: Correlação entre a) cobre e arsénio, b) ferro e arsénio

No Homem também foram realizados estudos com o intuito de compreender a absorção de vários elementos pelo organismo, nomeadamente do Fe, Cu e As (separadamente). Nestes estudos recorreu-se a uma linha germinal de células intestinais humanas, denominadas Caco-2, que se diferenciam espontaneamente quando expostas a determinados elementos, por forma a possibilitarem o transporte dos mesmos para o interior celular. Estes elementos podem ser o Fe, o Cu [105] e o As [106], entre outros.

6.2 Análise por EDXRF com geometria triaxial

Por motivos técnicos, com esta técnica apenas foram analisados os seguintes peixes:

- **Ensaio Preliminares** - C1;
- **Primeiro bioensaio** - A1, A2, B1, B2, C1, C2;

Nos resultados obtidos (Apêndice B) verificou-se uma tendência crescente da concentração de As entre os Grupos C e B e o Grupo A (Figura 6.15), também observada os resultados obtidos na Secção 6.1 para o peixe por inteiro (Figura 6.5). Apesar de mais elevados os valores, estes estão dentro da mesma ordem de grandeza dos obtidos por μ -EDXRF.

Em relação ao Fe e ao Cu, também se verificou uma tendência crescente das suas concentrações entre os Grupos A, B e C (Figura 6.16).

Todavia, não foram encontradas diferenças estatisticamente relevantes entre as concentrações de As, Cu e Fe nos diferentes grupos, ao contrário dos resultados da técnica anterior.

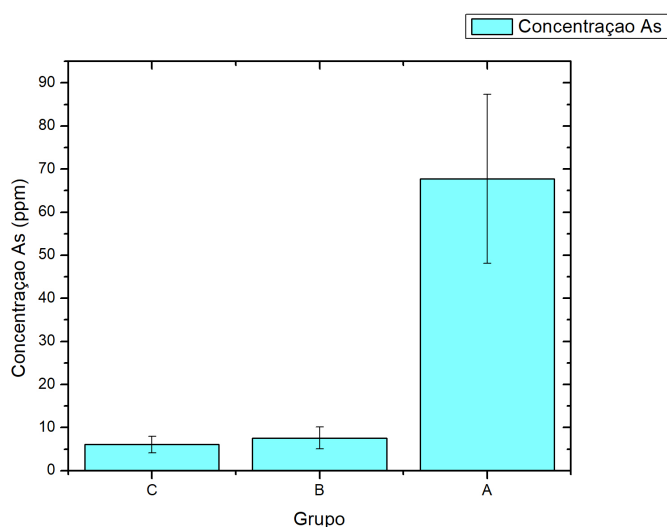


Figura 6.15: Concentração elementar média de arsénio em cada grupo

As diferenças entre esta técnica e a μ -EDXRF não são significativas. Contudo, visto que a quantificação dos elementos é determinada com base numa área muito reduzida no centro da amostra, estes valores poderão não corresponder ao valor real da concentração média no peixe inteiro.

6.3 Análise por ICP-AES

Tal como referido na Secção 4.6.2, esta técnica possui um DL na ordem dos ppb ($\mu\text{g/L}$). O material de referência utilizados foi o *Oyster Tissue* e obteve-se um DL para o As e Cu

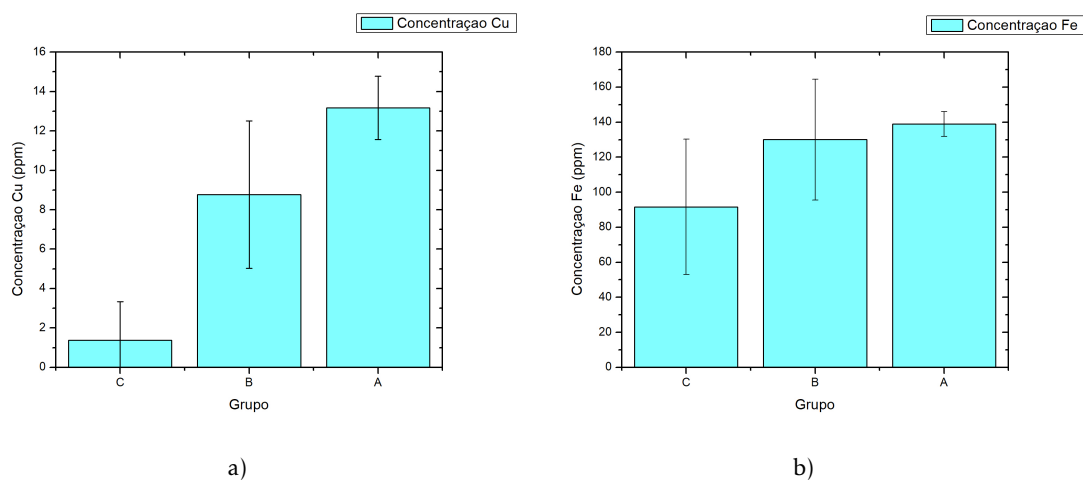


Figura 6.16: Concentrações elementares de a) cobre, b) ferro obtidas através da EDXRF com geometria triaxial

de 4 $\mu\text{g/L}$ e para o Fe de 14 $\mu\text{g/L}$.

Tal como observado nos resultados de μ -EDXRF e EDXRF com geometria triaxial, também nos resultados obtidos através de ICP-AES (Apêndice C) se pôde verificar um aumento significativo da concentração de As entre os Grupos C e B e o Grupo A (Figura 6.17).

Em relação ao Cu, também se observou uma tendência crescente entre os Grupos C e B e o Grupo A (Figura 6.18 a). No entanto, apenas se verificaram diferenças estatisticamente significativas ($p < 0.05$) entre os Grupos A e B.

No caso do Fe, observou-se um aumento da sua concentração entre os Grupos C e B ($p < 0.05$), mas entre os Grupos B e A não se observou uma grande variação (Figura 6.18 b).

Com esta técnica, para além da análise das amostras dos peixes utilizados neste estudo, efetuou-se também uma análise da água de cada um dos tanques e obteve-se:

- **Grupo C** - 0 ppm de As;
- **Grupo B** - 153.467 ppm \pm 0.008 de As;
- **Grupo A** - 330.31 ppm \pm 0.03 de As.

Podemos assim concluir que não ocorreu precipitação de As nos tanques, pelo que o As introduzido na água de cada tanque foi completamente dissolvido.

6.4 Comparação de resultados

As Figuras 6.19 e 6.20 mostram uma comparação das técnicas utilizadas neste estudo em relação à concentração média de As, Cu e Fe encontrada para cada grupo.

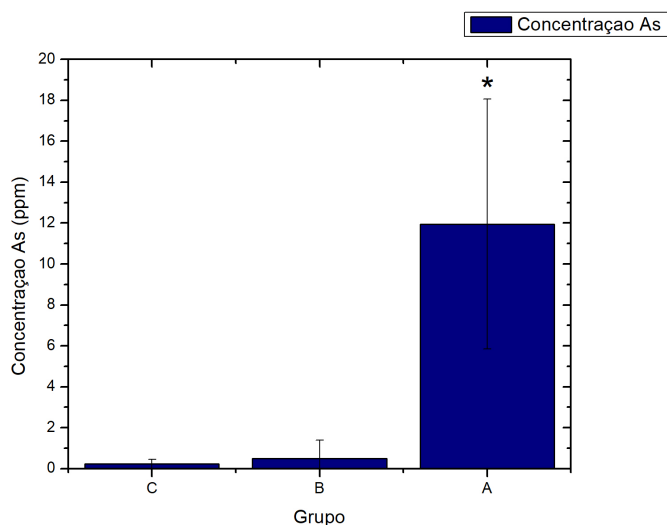


Figura 6.17: Concentração elementar média de arsênio em cada grupo. Os asteriscos indicam valores estatisticamente significativos ($p < 0.05$) do grupo exposto em relação ao grupo de controle

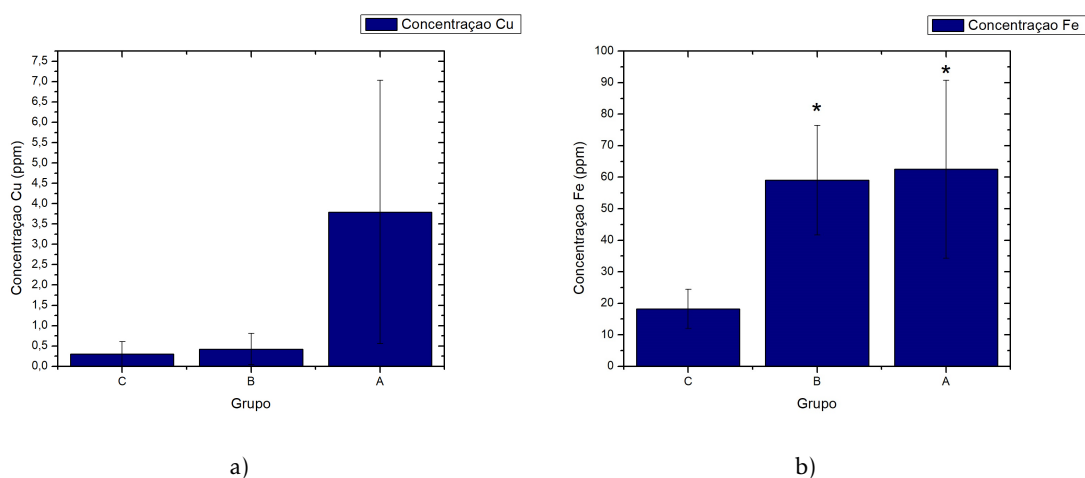


Figura 6.18: Concentrações elementares médias a) de cobre, b) de ferro obtidas através de ICP-AES. Os asteriscos indicam valores estatisticamente significativos ($p < 0.05$) do grupo exposto em relação ao grupo de controle

Podemos observar que, regra geral, os valores detetados para o As, Cu e Fe são superiores na técnica de μ -EDXRF, seguida da EDXRF com geometria triaxial e por fim pela ICP-AES.

Apesar de produzirem valores estatisticamente diferentes, as concentrações médias elementares obtidas entre as técnicas encontram-se dentro da mesma ordem de grandeza, e todas indicam uma tendência crescente de concentração para o As, Cu e Fe entre os grupos: $C < B < A$.

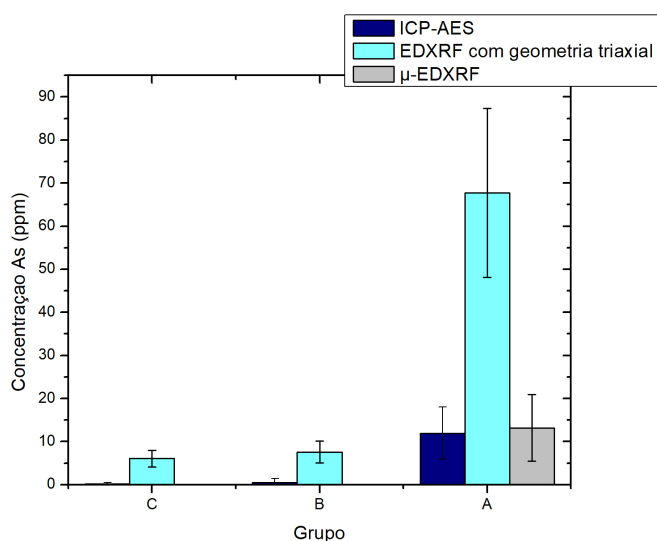


Figura 6.19: Comparação da concentração média de arsénio por grupo em cada técnica

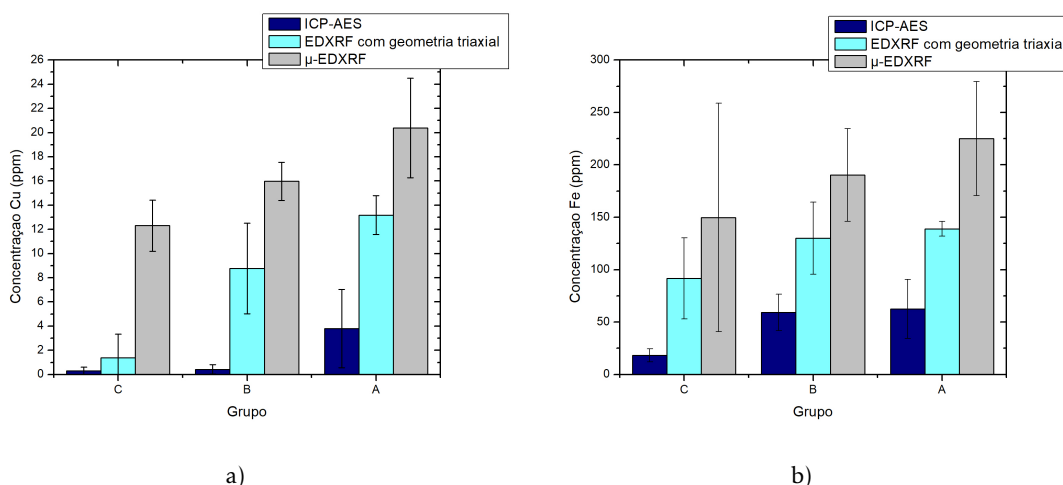


Figura 6.20: Comparação da concentração média a) de cobre, b) de ferro por grupo em cada técnica

6.5 Análise dos biomarcadores

6.5.1 Peroxidação Lipídica (LPO)

Os resultados obtidos para o ensaio da LPO encontram-se na Figura 6.21, sendo possível observar uma tendência crescente entre os grupos C e B em relação ao Grupo A, tendo-se verificado diferenças estatisticamente significativas entre o grupo de controlo e os restantes ($p < 0.05$).

Sunaina *et al.* [19] efetuaram um estudo no qual se mediu o teor de MDA no fígado e ovários de peixes-zebra após intoxicação com arsénio (0.006 e 0.03 mg/L) durante 7, 14, 21 e 28 dias; verificou-se um aumento entre o grupo de controlo e os grupos sujeitos a

uma cada vez maior concentração de arsénio.

Sarkar *et al.* [46] estudaram a relação entre baixas doses de As ($50 \mu\text{g/L}$) e a indução de produção de ROS no cérebro de peixes-zebra, tendo observado um aumento significativo da concentração de MDA entre o grupo controlo e o grupo exposto, após 7 dias. Concluíram que, mesmo em pequenas doses, o As é capaz de causar stress oxidativo no organismo destes peixes.

Contudo, Bagnyukova *et al.* [20] obtiveram diferentes resultados ao submeterem peixes-dourados (*Carassius auratus*) a $200 \mu\text{M}$ de arsenito durante 7 dias, não tendo verificado alterações significativas no nível de TBARS entre o grupo de controlo e o grupo exposto a As. Os resultados discrepantes em relação aos anteriormente indicados poderão estar relacionados com a diferente espécie utilizada neste estudo.

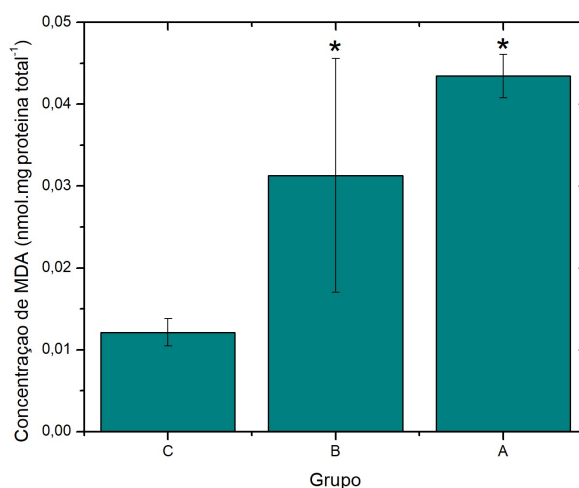


Figura 6.21: Comparação dos diferentes níveis de concentração de MDA em relação ao grupo de controlo e os expostos a arsénio

6.5.2 Glutathione S-Transferase (GST)

No ensaio relativo à GST também não se verificaram diferenças significativas a nível estatístico ($p > 0.05$). No entanto, tal como se pode ver na Figura 6.22, observou-se um acréscimo aparente da atividade de GST mediante a concentração de As, sendo sucessivamente superior nos grupos C, B e A.

Kim *et al.* estudaram o efeito de diferentes concentrações (50, 100, 200 e 400 ppb) de arsénio em rascassos (*Sebastes schlegelii*) durante 10 e 20 dias, tendo-se observado que os níveis da atividade da GST no fígado e nas brânquias vão aumentando entre peixes do grupo de controlo e os peixes do grupo sujeito a maior concentração nominal de As [44].

Todavia, Ventura-Lima *et al.* expuseram as brânquias de peixes-zebra, durante 48h, a diferentes concentrações de As (1, 10 e 100 ppb), não tendo verificado diferenças significativas da atividade da GST entre os vários grupos [22].

A GST auxilia à desintoxicação do organismo ao conjugar-se com moléculas endógenas, tais como propenóis, produtos da degradação oxidativa do ADN. O valor da GST poderá não ter variado significativamente por não terem sido utilizadas concentrações altas o suficiente para provocarem esse tipo de danos celulares [22] [107].

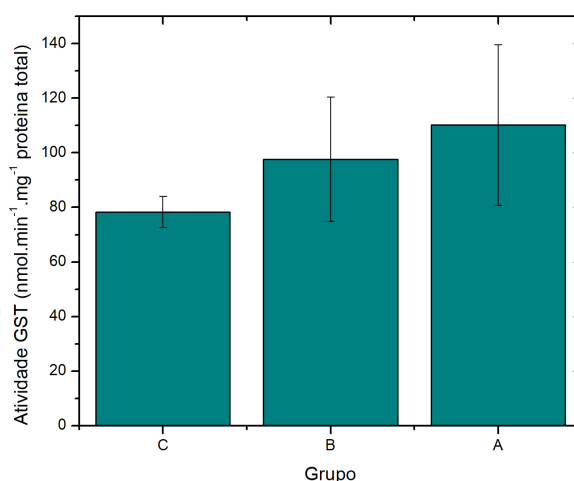


Figura 6.22: Comparação dos diferentes níveis de atividade da GST em relação ao grupo de controlo e os expostos a arsénio

6.5.3 Peroxidase de Glutathione (GPX)

A Figura 6.23 diz respeito à atividade da GPX, sendo possível observar uma tendência decrescente entre o controlo e os restantes grupos. Esta tendência foi demonstrada estatisticamente uma vez que foram encontradas diferenças relevantes ($p < 0.05$) dos Grupos A e B em relação ao Grupo C.

Outros autores verificaram também uma diminuição na atividade desta enzima das amostras sujeitas a As e das amostras de controlo, tendo assim o As funcionado como inibidor da GPX [108] [109].

Nos estudos de Jing *et al.* [110] e de Kang *et al.* [111] verificou-se esta inibição em células pertencentes à linha celular NB4 provenientes de pacientes humanos com Leucemia Promielocítica Aguda após exposição a As. Wang *et al.* [112] também observaram uma diminuição da atividade da GPX em células de ovários de hamsters após exposição a As.

Adeyemy *et al.* [113] estudaram o stress oxidativo de embriões de peixe-zebra quando expostos a 0.8 mM de arsénio durante 96h. Apesar de não terem observado diferenças estatísticas entre o grupo de controlo e o grupo exposto, observaram também uma diminuição da atividade da GPX entre esses grupos.

Contudo, Sarkar *et al.* [114] efetuaram um estudo no qual se expuseram peixes-zebra a 50 µg/L de As. Após 7 dias, observou-se um ligeiro aumento da atividade da GPX no fígado e rim, ainda que as alterações não sejam significativas ($p > 0.05$).

Tendo em conta estudos anteriores acima referidos, os resultados encontrados para esta enzima poderão ser explicados pela inibição da sua atividade pelo As.

Outro dos fatores que poderá ter contribuído para a sua diminuição está relacionado com o substrato deste biomarcador. Para a GPX atuar, necessita de H_2O_2 ou outro peróxido orgânico como substrato, competindo com a CAT, que possui este mesmo substrato, entre outros [115]. A diminuição verificada no nosso estudo poderá ter ocorrido devido à diminuição de H_2O_2 por este já ter sido reduzido a água pela CAT.

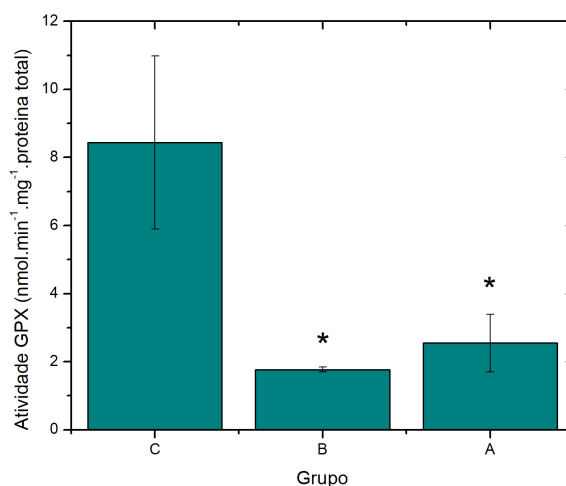


Figura 6.23: Comparação dos diferentes níveis de atividade da GPX em relação ao grupo de controlo e os expostos a arsénio. Os asteriscos indicam valores estatisticamente significativos ($p<0.05$) do grupo exposto em relação ao grupo de controlo

6.5.4 Superóxido Dismutase (SOD)

Para este biomarcador foram encontradas diferenças significativas ($p<0.05$) do Grupo C em relação ao Grupo A e deste em relação ao Grupo B. Na Figura 6.24 podemos observar uma tendência crescente à medida que a concentração de As aumenta.

No estudo de Kim *et al.* descrito na Secção 6.5.2, observou-se também um incremento da atividade da SOD à medida que a concentração de As aumenta [44].

Também Bagnyukova *et al.*, descrito na Secção 6.5.1, verificaram um acréscimo da atividade da SOD, neste caso apenas no fígado, de peixes-dourados após exposição ao As [20].

Altikat *et al.* realizaram um estudo com carpas (*Cyprinus carpio carpio*), que foram expostas a 0.5 e 1 mg/L de As durante um mês, tendo observado um aumento da percentagem de inibição da SOD nos rins e músculo dos peixes expostos a 0.5 mg/L mas um decréscimo da mesma no fígado, pele e intestinos. Nos peixes expostos a 1 mg/L, observou-se uma diminuição da inibição em todos os órgãos [116].

Podemos assim verificar que a atividade da SOD varia bastante entre espécies, entre órgãos e está dependente da concentração de As utilizada.

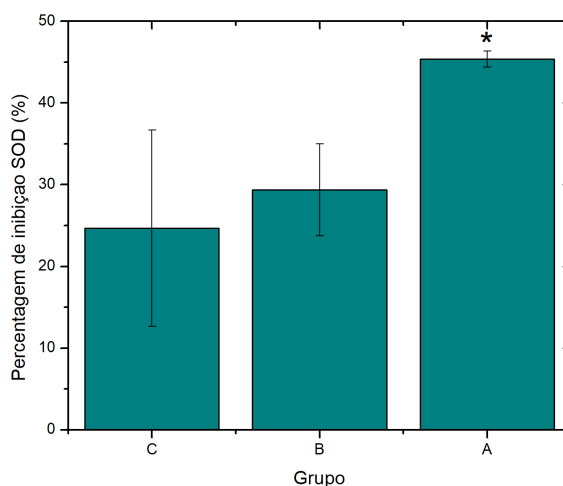


Figura 6.24: Comparação das diferentes percentagens de inibição da SOD em relação ao grupo de controlo e os expostos a arsénio. Os asteriscos indicam valores estatisticamente significativos ($p < 0.05$) do grupo exposto em relação ao grupo de controlo

6.5.5 Catalase (CAT)

Em relação à atividade da CAT, não se verificaram diferenças significativas entre os vários grupos ($p > 0.05$), mas é possível observar na Figura 6.25 uma ligeira diminuição do valor médio à medida que a concentração de As aumenta.

No estudo de Ventura-Lima *et al.* descrito na Secção 6.5.2 também não se observaram diferenças significativas na atividade da CAT nos peixes expostos a As após 48h. Neste mesmo estudo, verificou-se um aumento da GSH e de uma ligase necessária à sua formação, a GCL (Glutamato-Cisteína Ligase), sendo que a GSH ajuda a proteger a célula contra danos oxidativos adicionais, podendo ser esta uma das razões pelas quais a CAT não variou significativamente [22].

No entanto, no estudo realizado por Sunaina *et al.* descrito na Secção 6.5.1 observou-se uma diminuição da atividade desta enzima no fígado e ovários entre o grupo de controlo e os restantes. Esta diminuição poderá ser justificada pelos baixos níveis de NADPH encontrados nos peixes, uma vez que o NADPH é necessário para a manutenção da atividade da CAT [19].

Também no estudo efetuado por Adeyemy *et al.*, descrito na Secção 6.5.3, se observou uma diminuição significativa da atividade da CAT entre o grupo controlo e o grupo exposto a As [113]. A diminuição poderá ter ocorrido devido ao fluxo de radicais de superóxido, que poderão inibir a atividade da CAT [117] [118].

No estudo de Sarkar *et al.* [119], onde se expuseram peixes-zebra a 50 µg/L de As durante 7, 15, 30, 60 e 90 dias, apenas se verificou um acréscimo significativo da atividade da CAT nos rins e fígado dos organismos após 30 dias.

Os resultados destes estudos poderão indicar que, para as concentrações utilizadas no nosso estudo (150 e 300 ppb), teríamos que prolongar o ensaio para pelo menos um mês por forma a conseguirmos observar um aumento da atividade deste biomarcador.

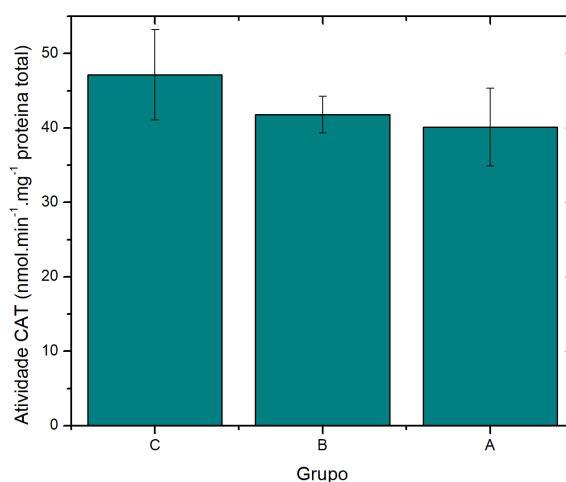


Figura 6.25: Comparação das diferentes percentagens de atividade da CAT em relação ao grupo de controlo e os expostos a arsénio

6.5.6 Ubiquitinas (Ub)

No que diz respeito ao nível de ubiquitinas, associado ao número de proteínas danificadas devido ao As, observámos alterações significativas entre o Grupo C e o Grupo A ($p < 0.05$). A Figura 6.26 ilustra os resultados obtidos, onde podemos observar um aumento das Ub nos grupos C e B em relação ao grupo A.

Apesar de não terem sido encontrados estudos na literatura que atestem a presença desta enzima em peixes expostos a As, a ligação entre ubiquitinas e As já foi previamente estabelecida por vários autores, nomeadamente Del Razo *et al.* [47]

O incremento observado nos nossos resultados comprovam que existe maior número de proteínas danificadas no Grupo A em relação aos Grupos B e C, significando que o As poderá ter causado esse dano.

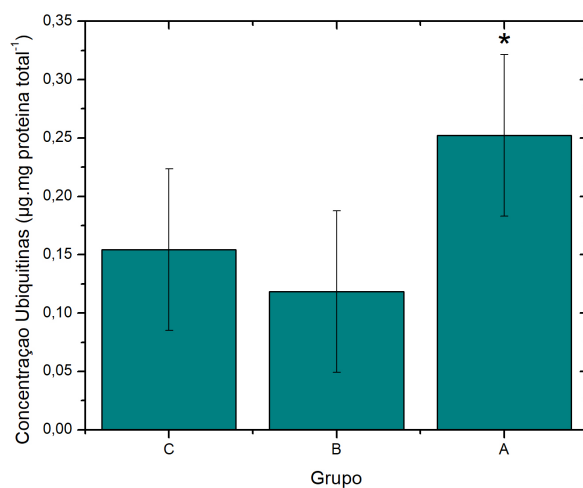


Figura 6.26: Comparação das diferentes concentrações de ubiquitinas em relação ao grupo de controlo e os expostos a arsénio. Os asteriscos indicam valores estatisticamente significativos ($p < 0.05$) dos grupo expostos em relação ao grupo de controlo

CONCLUSÕES E TRABALHOS FUTUROS

O principal objetivo deste estudo era compreender em que órgãos do peixe-zebra o As se deposita e a relação entre a sua concentração e a sua bioacumulação. Para tal, recorreram-se a várias técnicas: μ -EDXRF, EDXRF com geometria triaxial e ICP-AES. Para além disto, realizou-se ainda um estudo enzimático para compreender a variação da concentração de determinados biomarcadores em resultado da exposição a diferentes concentrações de As.

Através da μ -EDXRF foi possível obter uma análise qualitativa graças ao mapeamento das amostras, tendo-se observado uma maior concentração de As na zona das vísceras, em particular nos intestinos. Esta informação foi corroborada pela análise quantitativa efetuada pela mesma técnica, tendo-se concluído que a acumulação foi superior nos peixes pertencentes ao Grupo A. Também neste grupo se observou a bioacumulação de As no peixe por inteiro. No entanto, as concentrações deste elemento nas brânquias, cérebro, espinha e músculo dorsal encontram-se abaixo do limite de deteção.

Também através das restantes técnicas, que apenas nos facultam informação acerca da concentração de As no peixe por inteiro, se observou uma maior acumulação deste elemento nos peixes do Grupo A. Comparando os resultados obtidos com os da μ -EDXRF, observou-se que os valores obtidos através desta foram superiores aos da EDXRF com geometria triaxial e estes por sua vez superiores aos da ICP-AES, apesar de os valores se encontrarem quase sempre dentro da mesma ordem de grandeza.

A discrepância entre os valores da μ -EDXRF e os da EDXRF com geometria triaxial ocorreu devido ao facto da área de análise ser muito mais reduzida que o tamanho total do peixe. Isto significa que apenas uma região do peixe foi analisada, sendo que esta poderá estar num órgão que apresente maior ou menor concentração de um determinado elemento.

Os resultados de ICP-AES foram abaixo do expectável, principalmente tendo em conta

o alto limite de detecção das técnicas de EDXRF, bastante superior aos valores medidos em ICP-AES. Isto significa que a detecção de um elemento em EDXRF implica que a sua concentração real é igual ou superior ao DL deste elemento, facto que não se verificou nos resultados de ICP-AES.

Em relação ao estudo enzimático, o biomarcador que apresentou diferenças mais acentuadas e estatisticamente significativas entre os vários grupos foi a GPX, tendo-se observado uma diminuição entre o Grupo C e os restantes grupos. Tal decréscimo poderá ser justificado pelo facto de o As poder funcionar como inibidor desta enzima.

Também na LPO, SOD e Ub se verificaram diferenças estatisticamente significativas, tendo-se observado um aumento das mesmas em relação ao grupo de controlo. Concluímos assim que os peixes expostos a As entraram em stress oxidativo e que o elemento provocou a danificação de proteínas.

Em relação à GST e CAT, não se observaram diferenças relevantes entre os vários grupos.

Tendo em conta que existe uma enorme variabilidade intrínseca entre cada peixe, a nível de trabalhos futuros seria importante aumentar o número de indivíduos por forma a termos mais amostras em cada grupo. Deveria também ser estabelecido o período de tempo máximo para que os peixes sejam alimentados antes da eutanásia, com o intuito de evitar que os peixes analisados contenham matéria orgânica nos intestinos.

Para além disto, para obtermos resultados mais fidedignos da EDXRF com geometria triaxial deveriam-se homogeneizar as amostras e formar pastilhas com o tamanho do feixe, para que seja possível quantificar corretamente o peixe como um todo.

BIBLIOGRAFIA

- [1] Office of the Federal Register. *ATSDR – Priority List of Hazardous Substances*. 2014. URL: <https://www.atsdr.cdc.gov/spl/http://www.atsdr.cdc.gov/SPL/index.html> (acedido em 02/02/2017).
- [2] P. Table. *Arsenic and Arsenic Compounds (Book)*. Vol. 2002. 2004, pp. 1–484.
- [3] R. D. Tripathi, S. Srivastava, S. Mishra, N. Singh, R. Tuli, D. K. Gupta e F. J. M. Maathuis. “Arsenic hazards: strategies for tolerance and remediation by plants”. Em: *Trends in Biotechnology* 25.4 (2007), pp. 158–165. ISSN: 01677799. DOI: [10.1016/j.tibtech.2007.02.003](https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2007.02.003).
- [4] M. Pradesh. “Acute Toxicity Bioassay and Behavioural Responses”. Em: 45.March (2012), pp. 7–12.
- [5] D. J. Carlin, M. F. Naujokas, K. D. Bradham, J. Cowden, M. Heacock, H. F. Henry, J. S. Lee, D. J. Thomas, C. Thompson, E. J. Tokar, M. P. Waalkes, L. S. Birnbaum e W. A. Suk. “Arsenic and environmental health: State of the science and future research opportunities”. Em: *Environmental Health Perspectives* 124.7 (2016), pp. 890–899. ISSN: 15529924. DOI: [10.1289/ehp.1510209](https://doi.org/10.1289/ehp.1510209). URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26587579http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4937867>.
- [6] K. Howe, M. D. Clark, C. F. Torroja, J. Torrance e et al. Berthelot. “The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome”. Em: *Nature* 496.7446 (2013), pp. 498–503. ISSN: 0028-0836. DOI: [10.1038/nature12111](https://doi.org/10.1038/nature12111). URL: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nature12111>.
- [7] G. J. Lieschke e P. D. Currie. “Animal models of human disease: zebrafish swim into view.” Em: *Nature reviews. Genetics* 8.5 (2007), pp. 353–367. ISSN: 1471-0056. DOI: [10.1038/nrg2091](https://doi.org/10.1038/nrg2091). URL: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nrg2091>.
- [8] M. L. Carvalho, J. Brito e M. A. Barreiros. “Study of Trace Element Concentrations in Human Tissues by EDXRF Spectrometry”. Em: *X-Ray Spectrometry* 27.3 (1998), pp. 198–204. ISSN: 1097-4539. DOI: [10.1002/\(SICI\)1097-4539\(199805/06\)27:3<198::AID-XRS265>3.0.CO;2-B](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4539(199805/06)27:3<198::AID-XRS265>3.0.CO;2-B). URL: <http://doi.wiley.com/10.1002/{\%}28SICI{\%}291097-4539{\%}28199805/06{\%}2927{\%}3A3{\%}3C198{\%}3A{\%}3AAID-XRS265{\%}3E3.0.CO{\%}3B2-B>.

- [9] M. L. Carvalho, T. Magalhães, M. Becker e A. von Bohlen. “Trace elements in human cancerous and healthy tissues: A comparative study by EDXRF, TXRF, synchrotron radiation and PIXE”. Em: *Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy* 62.9 (2007), pp. 1004–1011. ISSN: 05848547. DOI: [10.1016/j.sab.2007.03.030](https://doi.org/10.1016/j.sab.2007.03.030).
- [10] M. Yaman. “Comprehensive comparison of trace metal concentrations in cancerous and non-cancerous human tissues.” Em: *Current medicinal chemistry* 13.21 (2006), pp. 2513–2525. ISSN: 09298673. DOI: [10.2174/092986706778201620](https://doi.org/10.2174/092986706778201620). URL: <http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article{\&}issn=0929-8673{\&}volume=13{\&}issue=21{\&}spage=2513>.
- [11] A. Al-Ebraheem, M. J. Farquharson e E. Ryan. “The evaluation of biologically important trace metals in liver, kidney and breast tissue”. Em: *Applied Radiation and Isotopes* 67.3 (2009), pp. 470–474. ISSN: 09698043. DOI: [10.1016/j.apradiso.2008.06.018](https://doi.org/10.1016/j.apradiso.2008.06.018).
- [12] A. Mohapatra, T. R. Rautray, V. Vijayan, R. K. Mohanty e S. K. Dey. “Trace elemental characterization of some food crustacean tissue samples by EDXRF technique”. Em: *Aquaculture* 270.1-4 (2007), pp. 552–558. ISSN: 00448486. DOI: [10.1016/j.aquaculture.2007.04.023](https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.04.023).
- [13] E. Ünlü e B. Gümgüm. “Concentrations of copper and zinc in fish and sediments from the Tigris River in Turkey”. Em: *Chemosphere* 26.11 (1993), pp. 2055–2061. ISSN: 00456535. DOI: [10.1016/0045-6535\(93\)90031-Y](https://doi.org/10.1016/0045-6535(93)90031-Y). arXiv: [arXiv: 1011.1669v3](https://arxiv.org/abs/1011.1669v3). URL: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/004565359390031Y>.
- [14] C. M. Alonso-Hernández, M. Gómez-Batista, M. Díaz-Asencio, J. Estévez-Alvares e R. Padilla-Alvares. “Total arsenic in marine organisms from Cienfuegos bay (Cuba)”. Em: *Food Chemistry* 130.4 (2012), pp. 973–976. ISSN: 03088146. DOI: [10.1016/j.foodchem.2011.07.087](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.07.087).
- [15] J. J. Vicente-Martorell, M. D. Galindo-Riaño, M. García-Vargas e M. D. Granado-Castro. “Bioavailability of heavy metals monitoring water, sediments and fish species from a polluted estuary”. Em: *Journal of Hazardous Materials* 162.2-3 (2009), pp. 823–836. ISSN: 03043894. DOI: [10.1016/j.jhazmat.2008.05.106](https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2008.05.106).
- [16] P. McGrath e C. Q. Li. “Zebrafish: a predictive model for assessing drug-induced toxicity”. Em: *Drug Discovery Today* 13.9-10 (2008), pp. 394–401. ISSN: 13596446. DOI: [10.1016/j.drudis.2008.03.002](https://doi.org/10.1016/j.drudis.2008.03.002).
- [17] J. Hallauer. “The Effect of Chronic Arsenic Exposure in Zebrafish”. Em: *Zebrafish* 00.00 (2016), pp. 1–8. ISSN: 15458547. DOI: [10.1089/zeb.2016.1252](https://doi.org/10.1089/zeb.2016.1252). URL: <http://online.liebertpub.com/doi/10.1089/zeb.2016.1252>.

- [18] A. S. Nayak, C. R. Lage e C. H. Kim. "Effects of low concentrations of arsenic on the innate immune system of the zebrafish (*Danio Rerio*)". Em: *Toxicological Sciences* 98.1 (2007), pp. 118–124. ISSN: 10966080. DOI: [10.1093/toxsci/kfm072](https://doi.org/10.1093/toxsci/kfm072). URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17400579><http://toxsci.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1093/toxsci/kfm072>.
- [19] Sunaina, A. K. Bhardwaj e B. A. Ansari. "Oxidative stress biomarkers in assessing arsenic tri oxide toxicity in the Zebrafish , *Danio rerio*". Em: *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies* 4.4 (2016), pp. 8–13. URL: <http://www.fisheriesjournal.com/archives/2016/vol4issue4/PartA/4-2-100-703.pdf>.
- [20] T. V. Bagnyukova, L. I. Luzhna, I. P. Pogribny e V. I. Lushchak. "Oxidative stress and antioxidant defenses in goldfish liver in response to short-term exposure to arsenite". Em: *Environmental and Molecular Mutagenesis* 48.8 (2007), pp. 658–665. ISSN: 08936692. DOI: [10.1002/em.20328](https://doi.org/10.1002/em.20328). URL: <http://doi.wiley.com/10.1002/em.20328>.
- [21] A Kabata-Pendias e H Pendias. *Trace elements in soils and plants*. 1992, p. 315. ISBN: 0849315751. DOI: [10.1201/b10158-25](https://doi.org/10.1201/b10158-25).
- [22] J. Ventura-Lima, M. R. de Castro, D. Acosta, D. Fattorini, F. Regoli, L. M. de Carvalho, D. Bohrer, L. A. Geracitano, D. M. Barros, L. F. F. Marins, R. S. da Silva, C. D. Bonan, M. R. Bogo e J. M. Monserrat. "Effects of arsenic (As) exposure on the antioxidant status of gills of the zebrafish *Danio rerio* (Cyprinidae)". Em: *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology* 149.4 (2009), pp. 538–543. ISSN: 15320456. DOI: [10.1016/j.cbpc.2008.12.003](https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2008.12.003).
- [23] S. Mahimairaja, N. S. Bolan, D. C. Adriano e B. Robinson. "Arsenic Contamination and its Risk Management in Complex Environmental Settings". Em: *Advances in Agronomy* 86 (2005), pp. 1–82. ISSN: 00652113. DOI: [10.1016/S0065-2113\(05\)86001-8](https://doi.org/10.1016/S0065-2113(05)86001-8).
- [24] H. U. W. Sabina C. Grund, Kunibert Hanusch e K. H. Sabina C. Grund. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2000. ISBN: 3527306730. DOI: [10.1002/14356007.a03_113.pub2](https://doi.org/10.1002/14356007.a03_113.pub2). URL: http://doi.wiley.com/10.1002/14356007.a03_{_}113http://doi.wiley.com/10.1002/14356007.a03_{_}113.pub2http://doi.wiley.com/10.1002/14356007.a03_{_}113{\\%}0Ahttp://doi.wiley.com/10.1002/14356007.a03_{_}113.pub2http://doi.wiley.com/10.1002/14356007.a03_{_}113{\\%}5Cnhttp://doi.wiley.com/10.1002/14356007.a03_{_}113{\\%}5Cn
- [25] R. N. Ratnaike. "Acute and chronic arsenic toxicity". Em: *Postgraduate Medical Journal* 79.933 (2003), pp. 391–396. ISSN: 0032-5473. DOI: [10.1136/pmj.79.933.391](https://doi.org/10.1136/pmj.79.933.391). URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12897217><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC1742758><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC1742758>

- www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12897217{\%}5Cn<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC1742758><http://pmj.bmj.com/cgi/doi>.
- [26] K Jomova, Z Jenisova, M Feszterova, S Baros, J Liska, D Hudecova, C. J. Rhodes e M Valko. "Arsenic: Toxicity, oxidative stress and human disease". Em: *Journal of Applied Toxicology* 31.2 (2011), pp. 95–107. ISSN: 0260437X. DOI: [10.1002/jat.1649](https://doi.org/10.1002/jat.1649).
- [27] J Huff, P Chan e A Nyska. "Is the human carcinogen arsenic carcinogenic to laboratory animals?" Em: *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 55.1 (2000), pp. 17–23. ISSN: 1096-6080. DOI: [10.1093/TOXSCI/55.1.17](https://doi.org/10.1093/TOXSCI/55.1.17). URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10788555>.
- [28] T. Sakurai, M. Ochiai, C. Kojima, T. Ohta, M. H. Sakurai, N. O. Takada, W. Qu, M. P. Waalkes, S. Himeno e K. Fujiwara. "Preventive mechanism of cellular glutathione in monomethylarsonic acid-induced cytolethality". Em: *Toxicology and Applied Pharmacology* 206.1 (2005), pp. 54–65. ISSN: 0041008X. DOI: [10.1016/j.taap.2004.11.008](https://doi.org/10.1016/j.taap.2004.11.008).
- [29] B. K. Mandal e K. T. Suzuki. "Arsenic round the world: A review". Em: *Talanta* 58.1 (2002), pp. 201–235. ISSN: 00399140. DOI: [10.1016/S0039-9140\(02\)00268-0](https://doi.org/10.1016/S0039-9140(02)00268-0). URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0039914002002680>.
- [30] D. J. Thomas, M. Styblo e S. Lin. "The Cellular Metabolism and Systemic Toxicity of Arsenic". Em: *Toxicology and Applied Pharmacology* 176.2 (2001), pp. 127–144. ISSN: 0041008X. DOI: [10.1006/taap.2001.9258](https://doi.org/10.1006/taap.2001.9258). URL: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0041008X01992580><http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041008X01992580>.
- [31] I Pizarro, M Gómez, C Cámara e M. A. Palacios. "Arsenic speciation in environmental and biological samples: Extraction and stability studies". Em: *Analytica Chimica Acta* 495.1-2 (2003), pp. 85–98. ISSN: 00032670. DOI: [10.1016/j.aca.2003.08.009](https://doi.org/10.1016/j.aca.2003.08.009).
- [32] P. P. Mahapatra, L. M. Mahapatra e B. Mishra. "Physicochemical Studies on Solid Solutions of Calcium Phosphorus Arsenic Hydroxyapatites". Em: *Bulletin of the Chemical Society of Japan* 62.10 (1989), pp. 3272–3277. ISSN: 0009-2673. DOI: [10.1246/bcsj.62.3272](https://doi.org/10.1246/bcsj.62.3272). URL: <http://www.journal.csj.jp/doi/10.1246/bcsj.62.3272>.
- [33] Z. Noor, S. B. Sumitro, M. Hidayat, A. H. Rahim, A. Sabarudin e T. Umemura. "Atomic Mineral Characteristics of Indonesian Osteoporosis by High-Resolution Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry". Em: *The Scientific World Journal* 2012 (2012), pp. 1–6. ISSN: 1537-744X. DOI: [10.1100/2012/372972](https://doi.org/10.1100/2012/372972). URL: <http://www.hindawi.com/journals/tswj/2012/372972> / <http://www>.

- pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3361221{\&}tool=pmcentrez{\&}rendertype=abstract{\%}5Cnhttp://www.hindawi.com/journals/tswj/2012/372972/.
- [34] S. U. Dani. “Osteoresorptive arsenic intoxication”. Em: *Bone* 53.2 (2013), pp. 541–545. ISSN: 87563282. DOI: 10.1016/j.bone.2013.01.017.
- [35] B. P. Rosen e Z. Liu. “Transport pathways for arsenic and selenium: A minireview”. Em: *Environment International* 35.3 (2009), pp. 512–515. ISSN: 01604120. DOI: 10.1016/j.envint.2008.07.023.
- [36] Z. Liu, M. A. Sanchez, X. Jiang, E. Boles, S. M. Landfear e B. P. Rosen. “Mammalian glucose permease GLUT1 facilitates transport of arsenic trioxide and methylarsonous acid”. Em: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 351.2 (2006), pp. 424–430. ISSN: 0006291X. DOI: 10.1016/j.bbrc.2006.10.054.
- [37] Z. Liu, J. Shen, J. M. Carbrey, R. Mukhopadhyay, P. Agre e B. P. Rosen. “Arsenite transport by mammalian aquaglyceroporins AQP7 and AQP9”. Em: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99.9 (2002), pp. 6053–6058. ISSN: 00278424. DOI: 10.1073/pnas.092131899. URL: <http://www.pnas.org/content/99/9/6053.full.pdf><http://www.pnas.org/content/99/9/6053>.
- [38] Z. Liu, J. M. Carbrey, P. Agre e B. P. Rosen. “Arsenic trioxide uptake by human and rat aquaglyceroporins”. Em: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 316.4 (2004), pp. 1178–1185. ISSN: 0006291X. DOI: 10.1016/j.bbrc.2004.03.003. URL: http://ac.els-cdn.com/S0006291X04004796/1-s2.0-S0006291X04004796-main.pdf?{_}tid=3146762a-1b7a-11e7-9a2b-00000aacb362{\&}acdnat=1491559908{_}282ca800a454f07d4d9874f5a70dd52a.
- [39] M. F. Hughes. “Arsenic toxicity and potential mechanisms of action”. Em: *Toxicology Letters* 133.1 (2002), pp. 1–16. ISSN: 03784274. DOI: 10.1016/S0378-4274(02)00084-X.
- [40] J. Ventura-Lima, M. R. Bogo e J. M. Monserrat. “Arsenic toxicity in mammals and aquatic animals: A comparative biochemical approach”. Em: *Ecotoxicology and Environmental Safety* 74.3 (2011), pp. 211–218. ISSN: 01476513. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2010.11.002.
- [41] L. J. Marnett. “Lipid peroxidation—DNA damage by malondialdehyde”. Em: *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 424.1-2 (1999), pp. 83–95. ISSN: 00275107. DOI: 10.1016/S0027-5107(99)00010-X. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002751079900010X>.

- [42] H. P. Singh, D. R. Batish, R. K. Kohli e K. Arora. "Arsenic-induced root growth inhibition in mung bean (*Phaseolus aureus* Roxb.) is due to oxidative stress resulting from enhanced lipid peroxidation". Em: *Plant Growth Regulation* 53.1 (2007), pp. 65–73. ISSN: 01676903. DOI: 10.1007/s10725-007-9205-z. URL: <http://link.springer.com/10.1007/s10725-007-9205-z>.
- [43] K. T. Kitchin e S. Ahmad. "Oxidative stress as a possible mode of action for arsenic carcinogenesis". Em: *Toxicology Letters* 137.1-2 (2003), pp. 3–13. ISSN: 03784274. DOI: 10.1016/S0378-4274(02)00376-4.
- [44] J. H. Kim e J. C. Kang. "The arsenic accumulation and its effect on oxidative stress responses in juvenile rockfish, *Sebastes schlegelii*, exposed to waterborne arsenic (As³⁺)". Em: *Environmental Toxicology and Pharmacology* 39.2 (2015), pp. 668–676. ISSN: 18727077. DOI: 10.1016/j.etap.2015.01.012. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25818984><http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1382668915000290>.
- [45] W. P. Lee, C. L. Lee e H. C. Lin. "Glutathione S-transferase and glutathione peroxidase are essential in the early stage of adriamycin resistance before P-glycoprotein overexpression in HOB1 lymphoma cells". Em: *Cancer Chemother Pharmacol* 38.1 (1996), pp. 45–51. ISSN: 0344-5704. DOI: 10.1007/s002800050446. URL: <http://link.springer.com/10.1007/s002800050446><http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8603451>.
- [46] S. Sarkar, S. Mukherjee, A. Chattopadhyay e S. Bhattacharya. "Low dose of arsenic trioxide triggers oxidative stress in zebrafish brain: Expression of antioxidant genes". Em: *Ecotoxicology and Environmental Safety* 107 (2014), pp. 1–8. ISSN: 10902414. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2014.05.012.
- [47] L. M. Del Razo, B. Quintanilla-Vega, E. Brambila-Colombres, E. S. Calderón-Aranda, M. Manno e A. Albores. "Stress Proteins Induced by Arsenic". Em: *Toxicology and Applied Pharmacology* 177.2 (2001), pp. 132–148. ISSN: 0041008X. DOI: 10.1006/taap.2001.9291. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11740912><http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0041008X01992919>.
- [48] M. S. Diniz, H. M. Santos, P. M. Costa, I. Peres, M. H. Costa e J. L. Capelo. "Metallothionein responses in the Asiatic clam (*Corbicula fluminea*) after exposure to trivalent arsenic." Em: *Biomarkers : biochemical indicators of exposure, response, and susceptibility to chemicals* 12.December (2007), pp. 589–598. ISSN: 1354-750X. DOI: 10.1080/13547500701507701. URL: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/13547500701507701>.
- [49] E. T. Fung, G. L. Wright e E. A. Dalmasso. "Proteomic strategies for biomarker identification: progress and challenges." Em: *Current opinion in molecular therapeutics* 2.6 (2000), pp. 643–650. ISSN: <null>. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11249741>.

- [50] J. P. Briggs. "The zebrafish: a new model organism for integrative physiology." Em: *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* 282.1 (2002), R3–R9. ISSN: 0363-6119. DOI: 10.1152/ajpregu.00589.2001. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11742817>.
- [51] J. Spitsbergen e M. Kent. "The State of the Art of the Zebrafish Model for Toxicology and Toxicologic Pathology Research - Advantages and Current Limitations". Em: *Toxicologic Pathology* 31.1 (2003), pp. 62–87. ISSN: 0192-6233. DOI: 10.1080/01926230390174959. arXiv: NIHMS150003. URL: <http://tpx.sagepub.com/cgi/doi/10.1080/01926230390174959>.
- [52] A. J. Hill, H. Teraoka, W. Heideman e R. E. Peterson. "Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity". Em: *Toxicological Sciences* 86.1 (2005), pp. 6–19. ISSN: 10966080. DOI: 10.1093/toxsci/kfi110. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15703261><http://toxsci.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1093/toxsci/kfi110>.
- [53] O. Bar-Ilan, R. M. Albrecht, V. E. Fako e D. Y. Furgeson. "Toxicity assessments of multisized gold and silver nanoparticles in zebrafish embryos". Em: *Small* 5.16 (2009), pp. 1897–1910. ISSN: 16136810. DOI: 10.1002/smll.200801716. URL: <http://doi.wiley.com/10.1002/smll.200801716>.
- [54] L. I. Zon e R. T. Peterson. "In vivo drug discovery in the zebrafish". Em: *Nature Reviews Drug Discovery* 4.1 (2005), pp. 35–44. ISSN: 1474-1776. DOI: 10.1038/nrd1606. URL: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nrd1606><http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15688071>.
- [55] P. V. Asharani, Y. Lian Wu, Z. Gong e S. Valiyaveetil. "Toxicity of silver nanoparticles in zebrafish models". Em: *Nanotechnology* 19.25 (2008), p. 255102. ISSN: 0957-4484. DOI: 10.1088/0957-4484/19/25/255102. URL: <http://stacks.iop.org/0957-4484/19/i=25/a=255102?key=crossref.010beab2fb10da6259295ee23c512dd9><http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21828644>.
- [56] W. Bai, Z. Zhang, W. Tian, X. He, Y. Ma, Y. Zhao e Z. Chai. "Toxicity of zinc oxide nanoparticles to zebrafish embryo: A physicochemical study of toxicity mechanism". Em: *Journal of Nanoparticle Research* 12.5 (2010), pp. 1645–1654. ISSN: 13880764. DOI: 10.1007/s11051-009-9740-9. URL: <http://link.springer.com/10.1007/s11051-009-9740-9>.
- [57] A. L. Menke, J. M. Spitsbergen, A. P. M. Wolterbeek e R. A. Woutersen. "Normal Anatomy and Histology of the Adult Zebrafish". Em: *Toxicologic Pathology* 39.5 (2011), pp. 759–775. ISSN: 0192-6233. DOI: 10.1177/0192623311409597. URL: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0192623311409597>.

- [58] R. White, K. Rose e L. Zon. "Zebrafish cancer: the state of the art and the path forward". Em: *Nature Reviews Cancer* 13.9 (2013), pp. 624–636. ISSN: 1474-175X. DOI: 10.1038/nrc3589. URL: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nrc3589>.
- [59] I. M. McGonnell e R. C. Fowkes. "Fishing for gene function - Endocrine modelling in the zebrafish". Em: *Journal of Endocrinology* 189.3 (2006), pp. 425–439. ISSN: 00220795. DOI: 10.1677/joe.1.06683. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16731775><http://joe.endocrinology-journals.org/cgi/doi/10.1677/joe.1.06683>.
- [60] S. J. S. Flora. *Handbook of Arsenic Toxicology*. Elsevier Inc., 2015. ISBN: 978-0-12-418688. URL: [https://books.google.pt/books?id=ze1DBAAAQBAJ{\&}pg=PA516{\&}lpg=PA516{\&}dq=Effects+of+low+concentrations+of+arsenic+on+the+innate+immune+system+of+the+zebrafish+\(Danio+rerio\){\&}source=bl{\&}ots=1wv0gq0syz{\&}sig=Ct7CF9NW5umyvCMmR1iPVkUiDg8{\&}hl=pt-PT{\&}sa=X{\&}ved=0ahUKEwiBhMj](https://books.google.pt/books?id=ze1DBAAAQBAJ{\&}pg=PA516{\&}lpg=PA516{\&}dq=Effects+of+low+concentrations+of+arsenic+on+the+innate+immune+system+of+the+zebrafish+(Danio+rerio){\&}source=bl{\&}ots=1wv0gq0syz{\&}sig=Ct7CF9NW5umyvCMmR1iPVkUiDg8{\&}hl=pt-PT{\&}sa=X{\&}ved=0ahUKEwiBhMj).
- [61] H. Bowen. *Nuclear Analytical Techniques in Medicine*. Vol. 8. 1988, pp. 1–17. ISBN: 9780444429117. DOI: 10.1016/S0167-9244(08)70218-X. URL: https://books.google.pt/books?hl=pt-PT{\&}lr={\&}id=eVFspUR1e{_}0C{\&}oi=fnd{\&}pg=PP2{\&}ots=CbR2{_}mU1vD{\&}sig=QDjC1I66uaLS9FXmgzq83S4o{_}-A{\&}redir{_}esc=y{\#}v=onepage{\&}q{\&}f=falsehttp://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016792440870218X.
- [62] R. Klockenkamper e A. von Bohlen. "Total-reflection x-ray fluorescence analysis and related methods". Em: 2015, p. 555. ISBN: 9781118460276.
- [63] R. Sitko e B. Zawisza. "X-Ray Fluorescence Spectrometry". Em: *X-Ray Spectroscopy* (2012). Ed. por S. K. Sharma, pp. 137–162. ISSN: 978-953-307-967-7. DOI: 10.5772/1422. URL: <http://www.intechopen.com/books/x-ray-spectroscopy><http://www.intechopen.com/books/x-ray-spectroscopy/quantification-in-x-ray-fluorescence-spectrometry>.
- [64] S. C. C. Ting. *Interaction of Photons with Matter*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1981, pp. 619–638. ISBN: 3-540-25041-7. DOI: 10.1016/B978-0-08-057230-7.50021-4. URL: http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-11241-6{_}4<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780080572307500214>.
- [65] E. B. Podgorsak. *Radiation Physics for Medical Physicists*. Springer, 2010, p. 745. ISBN: 978-3-642-00874-7. DOI: 10.1007/978-3-642-008745-7.
- [66] J. A. Sorenson, S. R. Cherry e Phelps. "Chapter 06 - Interaction Radiation Matter". Em: *Physics in Nuclear Medicine*. 2012, pp. 63–85. ISBN: 9781416051985. DOI: 10.1016/B978-1-4160-5198-5.00006-X.

- [67] R. Hobbie e B. Roth. "Interaction of Photons and Charged Particles with Matter". Em: *Intermediate Physics for Medicine and Biology* (2007), pp. 401–435. DOI: 10.1007/978-0-387-49885-0_15. URL: http://link.springer.com/10.1007/978-0-387-49885-0_{_}15<http://www.springerlink.com/index/R095N141707PX02V.pdf>.
- [68] E. B. Podgorsak. "Review of Radiation Oncology Physics: A Handbook for Teachers and Students". Em: *British journal of cancer* 98.May (2008), p. 1020. ISSN: 00942405. DOI: 10.1038/sj.bjc.6604224. arXiv: S0031-9155(02)36442-X.
- [69] J. Gilfrich. "Handbook of X-Ray Spectrometry: Methods and Techniques Edited by: Rene E. Van Grieken and Andrzej A. Markowicz Published by Marcel Dekker, Inc., New York, 1993; xiv + 704 pp., \$195, ISBN 0-8247-8483-9". Em: *X-Ray Spectrometry* 23.1 (1994), pp. 45–46. ISSN: 0049-8246. DOI: 10.1002/xrs.1300230110. URL: <http://doi.wiley.com/10.1002/xrs.1300230110>.
- [70] D. S. U. Dr. Reinhold Schlotz. *Bruker: XRF - X-ray Fluorescence*. 2006. URL: <https://www.bruker.com/products/x-ray-diffraction-and-elemental-analysis/x-ray-fluorescence.html>.
- [71] N. Ekinici, R. Ekinici, R. Polat e G. Budak. "Analysis of trace elements in medicinal plants with energy dispersive X-ray fluorescence". Em: *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* 260.1 (2004), pp. 127–131. ISSN: 02365731. DOI: 10.1023/B:JRNC.0000027071.72742.ee. URL: <http://link.springer.com/10.1023/B:JRNC.0000027071.72742.ee>.
- [72] H. Rowe, N. Hughes e K. Robinson. "The quantification and application of handheld energy-dispersive x-ray fluorescence (ED-XRF) in mudrock chemostratigraphy and geochemistry". Em: *Chemical Geology* 324-325 (2012), pp. 122–131. ISSN: 00092541. DOI: 10.1016/j.chemgeo.2011.12.023.
- [73] L. Bonizzoni, C. Colombo, S. Ferrati, M. Gargano, M. Greco, N. Ludwig e M. Re-alini. "A critical analysis of the application of EDXRF spectrometry on complex stratigraphies". Em: *X-Ray Spectrometry* 40.4 (2011), pp. 247–253. ISSN: 00498246. DOI: 10.1002/xrs.1320. URL: <http://doi.wiley.com/10.1002/xrs.1320>.
- [74] Bruker Corporation. *M4_Training_FR*. 2014.
- [75] D. N. Papadopoulou, G. A. Zachariadis, A. N. Anthemidis, N. C. Tsirliganis e J. A. Stratis. "Development and optimisation of a portable micro-XRF method for in situ multi-element analysis of ancient ceramics". Em: *Talanta* 68.5 (2006), pp. 1692–1699. ISSN: 00399140. DOI: 10.1016/j.talanta.2005.08.051.
- [76] M. Wiedenbeck. "Fast Mapping With μ -XRF". Em: *Elements Magazine* (2014).
- [77] M. Prisal. "Estudo comparativo da composição química das amêijoas disponíveis ao consumidor final". Em: (2010), p. 12.

- [78] D. Guimarães. "Measurement of Lead Concentration in Biological Tissues by Atomic Spectroscopy Techniques". Em: December (2011).
- [79] T. Magalhães, A. von Bohlen, M. L. Carvalho e M. Becker. "Trace elements in human cancerous and healthy tissues from the same individual: A comparative study by TXRF and EDXRF". Em: *Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy* 61.10-11 SPEC. ISS. (2006), pp. 1185–1193. ISSN: 05848547. DOI: 10.1016/j.sab.2006.06.002. URL: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0584854706001716>.
- [80] R. Tanaka, K. Yuge, J. Kawai e H. Alawadhi. "Artificial peaks in energy dispersive X-ray spectra: sum peaks, escape peaks, and diffraction peaks". Em: *X-Ray Spectrometry* 46.1 (2017), pp. 5–11. ISSN: 10974539. DOI: 10.1002/xrs.2697. URL: <http://doi.wiley.com/10.1002/xrs.2697>.
- [81] P. Custódio, M. L. Carvalho, F. Nunes, S. Pedroso e A. Campos. "Direct analysis of human blood (mothers and newborns) by energy dispersive X-ray fluorescence". Em: *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 19.2-3 (2005), pp. 151–158. ISSN: 0946672X. DOI: 10.1016/j.jtemb.2005.09.002. URL: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0946672X05001045>.
- [82] A. Rindby. "Software for energy-dispersive X-ray fluorescence". Em: *X-Ray Spectrometry* 18.3 (1989), pp. 113–118. ISSN: 10974539. DOI: 10.1002/xrs.1300180308. URL: <http://doi.wiley.com/10.1002/xrs.1300180308>.
- [83] R. Rousseau. "Detection limit and estimate of uncertainty of analytical XRF results". Em: *The Rigaku Journal* 18.2 (2001), pp. 33–47. URL: <https://pdfs.semanticscholar.org/27b0/909bf0c21a2825f85f629806db32ef1016f1.pdf><http://www.rigaku.com/downloads/journal/Vol18.2.2001/Rousseau.pdf>.
- [84] N. Ramos. "Estudo da Concentração Elementar em Tecidos Biológicos: Trigo e Eucalipto". Tese de doutoramento. Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, 2015. URL: https://run.unl.pt/bitstream/10362/18304/1/Ramos_{_}2015.pdf.
- [85] F. Dunnivant e J. Ginsbach. "Flame Atomic Absorbance and Emission Spectroscopy and Inductively Coupled Spectrometry - Mass Spectrometry". Em: *Flame Atomic Absorbance and Emission Spectroscopy and Inductively Coupled Spectrometry - Mass Spectrometry* (2009), chapter 1,3,4 e 5.
- [86] A. G. Correia. "Desenvolvimento de Modelos Metrológicos Detalhados da Determinação de Metais Pesados em Corretivos Orgânicos - Dissertação de Mestrado". Tese de doutoramento. 2012.
- [87] Bhavani K e Karuppasamy R. "Acute Toxicity Bioassay and Behavioural Changes on Zebrafish, *Danio rerio* (Hamilton) Under Arsenic Trioxide". Em: *International Journal of Modern Research and Reviews* 2.1 (2014), pp. 40–46. URL: <http://journalijmrr.com/wp-content/uploads/2014/01/RK14.pdf>.

- [88] E. Guidelines. "Guidelines for Use of Zebrafish in the NIH Intramural Research Program Scientific". Em: (2009), pp. 1–4. URL: <https://oacu.oir.nih.gov/sites/default/files/uploads/arac-guidelines/zebrafish.pdf>.
- [89] J. Silveira, J. Godinho, A. Mata, M. L. Carvalho e S. Pessanha. "Assessment of teeth elemental content using μ -EDXRF: Effects by in-office and at-home bleaching products". Em: *X-Ray Spectrometry* 44.1 (2015), pp. 3–6. ISSN: 10974539. DOI: 10.1002/xrs.2569. URL: <http://doi.wiley.com/10.1002/xrs.2569>.
- [90] I. Santos, M. S. Diniz, M. L. Carvalho e J. P. Santos. "Assessment of essential elements and heavy metals content on *Mytilus galloprovincialis* from river Tagus estuary". Em: *Biological Trace Element Research* 159.1-3 (2014), pp. 233–240. ISSN: 15590720. DOI: 10.1007/s12011-014-9974-y. URL: <http://link.springer.com/10.1007/s12011-014-9974-y>.
- [91] M. M. Bradford. "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding". Em: *Analytical Biochemistry* 72.1-2 (1976), pp. 248–254. ISSN: 10960309. DOI: 10.1016/0003-2697(76)90527-3. arXiv: arXiv:1011.1669v3. URL: http://hoffman.cm.utexas.edu/courses/bradford{_}assay.pdf.
- [92] H. Ohkawa, N. Ohishi e K. Yagi. "Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction". Em: *Analytical Biochemistry* 95.2 (1979), pp. 351–358. ISSN: 10960309. DOI: 10.1016/0003-2697(79)90738-3. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/36810>.
- [93] D. Madeira, L. Narciso, H. Cabral, C. Vinagre e M. Diniz. "Influence of temperature in thermal and oxidative stress responses in estuarine fish". Em: *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 166.2 (2013), pp. 237–243. ISSN: 10956433. DOI: 10.1016/j.cbpa.2013.06.008. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23774589><http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1095643313001645><http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1095643313001645>.
- [94] W. H. Habig, M. J. Pabst e W. B. Jakoby. "Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation." Em: *The Journal of biological chemistry* 249.22 (1974), pp. 7130–9. ISSN: 0021-9258. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4436300>.
- [95] D. Madeira, C. Vinagre e M. S. Diniz. "Are fish in hot water? Effects of warming on oxidative stress metabolism in the commercial species *Sparus aurata*". Em: *Ecological Indicators* 63 (2016), pp. 324–331. ISSN: 1470160X. DOI: 10.1016/j.ecolind.2015.12.008. URL: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1470160X15007104>.

- [96] R. A. Lawrence e R. F. Burk. "Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver." Em: *Biochemical and biophysical research communications* 71.4 (1976), pp. 952–958. ISSN: 0006-291X. DOI: [10.1016/0006-291X\(76\)90747-6](https://doi.org/10.1016/0006-291X(76)90747-6). URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/971321>.
- [97] M. Pervin, M. A. Hasnat, Y. M. Lee, D. H. Kim, J. E. Jo e B. O. Lim. "Antioxidant activity and acetylcholinesterase inhibition of grape skin anthocyanin (GSA)". Em: *Molecules* 19.7 (2014), pp. 9403–9418. ISSN: 14203049. DOI: [10.3390/molecules19079403](https://doi.org/10.3390/molecules19079403). URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25389100>.
- [98] L. H. Johansson e L. A. Håkan Borg. "A spectrophotometric method for determination of catalase activity in small tissue samples". Em: *Analytical Biochemistry* 174.1 (1988), pp. 331–336. ISSN: 10960309. DOI: [10.1016/0003-2697\(88\)90554-4](https://doi.org/10.1016/0003-2697(88)90554-4). URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3064653>.
- [99] D. Madeira, C. Vinagre, P. M. Costa e M. S. Diniz. "Histopathological alterations, physiological limits, and molecular changes of juvenile *Sparus aurata* in response to thermal stress". Em: *Marine Ecology Progress Series* 505 (2014), pp. 253–266. ISSN: 01718630. DOI: [10.3354/meps10794](https://doi.org/10.3354/meps10794). URL: <http://www.int-res.com/abstracts/meps/v505/p253-266/>.
- [100] M. Hamdi, M. Yoshinaga, C. Packianathan, J. Qin, J. Hallauer, J. R. McDermott, H. C. Yang, K. J. Tsai e Z. Liu. "Identification of an S-adenosylmethionine (SAM) dependent arsenic methyltransferase in *Danio rerio*". Em: *Toxicology and Applied Pharmacology* 262.2 (2012), pp. 185–193. ISSN: 0041008X. DOI: [10.1016/j.taap.2012.04.035](https://doi.org/10.1016/j.taap.2012.04.035). URL: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0041008X1200186X>.
- [101] N Bury. "Iron acquisition by teleost fish". Em: *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 135.2 (2003), pp. 97–105. ISSN: 15320456. DOI: [10.1016/S1532-0456\(03\)00021-8](https://doi.org/10.1016/S1532-0456(03)00021-8). URL: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1532045603000218><http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0037823055&partnerID=tZ0tx3y1>.
- [102] M. Rubio, R. D. Perez, C. A. Perez, A. H. Eynard e G. A. Bongiovanni. "Synchrotron microscopic X-ray fluorescence analysis of the effects of chronic arsenic exposure in rat brain". Em: *Radiation Physics and Chemistry* 77.1 (2008), pp. 1–8. ISSN: 0969806X. DOI: [10.1016/j.radphyschem.2007.06.010](https://doi.org/10.1016/j.radphyschem.2007.06.010). URL: http://ac.elsa-cdn.com/S0969806X0700285X/1-s2.0-S0969806X0700285X-main.pdf?_tid=0d38bbfa-51fb-11e7-8f73-00000aacb35f&acdnat=1497552616_13f9172ad3043633f3b0702fcb5a9815.
- [103] O. Ademuyiwa e B. Elsenhans. "Time course of arsenite-induced copper accumulation in rat kidney". Em: *Biological Trace Element Research* 74.1 (2000), pp. 81–92. ISSN: 0163-4984. DOI: [10.1385/BTER:74:1:81](https://doi.org/10.1385/BTER:74:1:81). URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11049202><http://link.springer.com/10.1385/BTER:74:1:81>.

- [104] P. N. Rubatto Birri, R. D. Pérez, D. Cremonezzi, C. A. Pérez, M. Rubio e G. A. Bongiovanni. "Association between As and Cu renal cortex accumulation and physiological and histological alterations after chronic arsenic intake". Em: *Environmental Research* 110.5 (2010), pp. 417–423. ISSN: 00139351. DOI: [10.1016/j.envres.2009.09.002](https://doi.org/10.1016/j.envres.2009.09.002). URL: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0013935109001704>.
- [105] O. Han e M. Wessling-Resnick. "Copper repletion enhances apical iron uptake and transepithelial iron transport by Caco-2 cells". Em: *American Journal of Physiology* 282.3 (2002), G527–G533. ISSN: 0193-1857. DOI: [10.1152/ajpgi.00414.2001](https://doi.org/10.1152/ajpgi.00414.2001). URL: <http://ajpgi.physiology.org/lookup/doi/10.1152/ajpgi.00414.2001>.
- [106] M. Calatayud, J. Gimeno, D. Vélez, V. Devesa e R. Montoro. "Characterization of the intestinal absorption of arsenate, monomethylarsonic acid, and dimethylarsinic acid using the caco-2 cell line". Em: *Chemical Research in Toxicology* 23.3 (2010), pp. 547–556. ISSN: 0893228X. DOI: [10.1021/tx900279e](https://doi.org/10.1021/tx900279e). URL: <http://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/tx900279e>.
- [107] N Nagalakshmi e M. N. Prasad. "Responses of glutathione cycle enzymes and glutathione metabolism to copper stress in *Scenedesmus bijugatus*". Em: *Plant Science* 160.2 (2001), pp. 291–299. ISSN: 01689452. DOI: [10.1016/S0168-9452\(00\)00392-7](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(00)00392-7). URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11164601>.
- [108] S. Shen, X. F. Li, W. R. Cullen, M. Weinfeld e X. C. Le. "Arsenic binding to proteins". Em: *Chemical Reviews* 113.10 (2013), pp. 7769–7792. ISSN: 00092665. DOI: [10.1021/cr300015c](https://doi.org/10.1021/cr300015c). URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23808632><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC3797521>.
- [109] M. Vahter. "Mechanisms of arsenic biotransformation". Em: *Toxicology* 181-182 (2002), pp. 211–217. ISSN: 0300483X. DOI: [10.1016/S0300-483X\(02\)00285-8](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(02)00285-8).
- [110] Y. Jing, J. Dai, R. M. Chalmers-Redman, W. G. Tatton e S. Waxman. "Arsenic Trioxide Selectively Induces Acute Promyelocytic Leukemia Cell Apoptosis Via a Hydrogen Peroxide-Dependent Pathway". Em: *Blood* 94.6 (1999), pp. 2102–2111. ISSN: 0006-4971. URL: <http://www.bloodjournal.org/content/bloodjournal/94/6/2102.full.pdf>.
- [111] S.-H. Kang, J.-H. Song, H.-K. Kang, J.-H. Kang, S.-J. Kim, H.-W. Kang, Y.-K. Lee e D.-B. Park. "Arsenic trioxide-induced apoptosis is independent of stress-responsive signaling pathways but sensitive to inhibition of inducible nitric oxide synthase in HepG2 cells." Em: *Experimental & molecular medicine* 35.2 (2003), pp. 83–90. ISSN: 1226-3613. DOI: [10.1038/emm.2003.12](https://doi.org/10.1038/emm.2003.12). URL: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/emm.2003.12><http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12754411>.

- [112] T. S. Wang, Y. F. Shu, Y. C. Liu, K. Y. Jan e H Huang. "Glutathione peroxidase and catalase modulate the genotoxicity of arsenite". Em: *Toxicology* 121.3 (1997), pp. 229–237. ISSN: 0300483X. DOI: 10.1016/S0300-483X(97)00071-1. URL: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0300483X97000711>.
- [113] J. A. Adeyemi, A. Da Cunha Martins e F. Barbosa. "Teratogenicity, genotoxicity and oxidative stress in zebrafish embryos (Danio rerio) co-exposed to arsenic and atrazine". Em: *Comparative Biochemistry and Physiology Part - C: Toxicology and Pharmacology* 172-173 (2015), pp. 7–12. ISSN: 18781659. DOI: 10.1016/j.cbpc.2015.04.001. URL: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1532045615000393>.
- [114] S. Sarkar, S. Mukherjee, A. Chattopadhyay e S. Bhattacharya. "Differential modulation of cellular antioxidant status in zebrafish liver and kidney exposed to low dose arsenic trioxide". Em: *Ecotoxicology and Environmental Safety* 135 (2017), pp. 173–182. ISSN: 10902414. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2016.09.025. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0147651316303785>.
- [115] M. Valko, C. J. Rhodes, J. Moncol, M. Izakovic e M. Mazur. *Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer*. 2006. DOI: 10.1016/j.cbi.2005.12.009. arXiv: arXiv:1011.1669v3. URL: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0009279705004333>.
- [116] S. Altikat, K. Uysal, H. I. Kuru, M. Kavasoglu, G. N. Ozturk e A. Kucuk. "The effect of arsenic on some antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in various tissues of mirror carp (Cyprinus carpio carpio)". Em: *Environmental Science and Pollution Research* 22.5 (2015), pp. 3212–3218. ISSN: 0944-1344. DOI: 10.1007/s11356-014-2896-6. URL: <http://link.springer.com/10.1007/s11356-014-2896-6>.
- [117] E. O. Farombi, O. A. Adelowo e Y. R. Ajimoko. "Biomarkers of oxidative stress and heavy metal levels as indicators of environmental pollution in African cat fish (Clarias gariepinus) from Nigeria Ogun River". Em: *International Journal of Environmental Research and Public Health* 4.2 (2007), pp. 158–165. ISSN: 16604601. DOI: 10.3390/ijerph2007040011. URL: <http://www.mdpi.com/1660-4601/4/2/158/>.
- [118] B. Stanic, N. Andric, S. Zoric, G. Grubor-Lajsic e R. Kovacevic. "Assessing pollution in the Danube River near Novi Sad (Serbia) using several biomarkers in sterlet (Acipenser ruthenus L.)". Em: *Ecotoxicology and Environmental Safety* 65.3 (2006), pp. 395–402. ISSN: 01476513. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2005.08.005. URL: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0147651305002150>.
- [119] S. Sarkar, S. Mukherjee, A. Chattopadhyay e S. Bhattacharya. "Low dose of arsenic trioxide triggers oxidative stress in zebrafish brain: Expression of antioxidant

genes". Em: *Ecotoxicology and Environmental Safety* 107 (2014), pp. 1–8. ISSN: 10902414. DOI: [10.1016/j.ecoenv.2014.05.012](https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.05.012).



VALORES ASSOCIADOS À μ -EDXRF

Tabela A.1: Comparação dos valores de referência da amostra-padrão *Oyster Tissue* com as concentrações elementares medidas (*Valor não certificado)

Elemento	Certificado ($\mu\text{g/g}$)	Obtido ($\mu\text{g/g}$)
P	8100*	7100 ± 400
Cl	10000*	11000 ± 60
K	9690 ± 50	10610 ± 600
Ca	1500 ± 30	1400 ± 70
Mn	17.5 ± 1.2	19 ± 1
Fe	195 ± 34	220 ± 20
Cu	63.0 ± 3.5	61 ± 3
Zn	852 ± 14	750 ± 40
Br	55*	57 ± 3
Sr	10.36 ± 0.56	17 ± 1
As	13.4 ± 1.9	11 ± 1

Tabela A.2: Comparação dos valores de referência da amostra-padrão *Orchard Leaves* com as concentrações elementares medidas (*Valor não certificado)

Elemento	Certificado ($\mu\text{g/g}$)	Obtido ($\mu\text{g/g}$)
P	2100 ± 100	1800 ± 90
Cl	700*	1900 ± 100
K	14700 ± 300	15300 ± 800
Ca	20900 ± 300	19900 ± 900
Mn	91 ± 4	83 ± 4
Fe	300 ± 20	300 ± 20
Cu	12 ± 1	12 ± 1
Zn	25 ± 3	26 ± 2
Br	10*	7 ± 1
Sr	37*	17 ± 1
As	14 ± 2	13 ± 1

Tabela A.3: Dados associados à concentração elementar média de As, Fe e Cu obtida em função das áreas analisadas, para o Grupo A

Área	Brânquias	Cérebro	Espinha	Inteiro	Intestinos	Músculo	Vísceras
Concentração As ($\mu\text{g/g}$)	2 ± 3	0	0	13 ± 8	70 ± 30	0	30 ± 20
Concentração Fe ($\mu\text{g/g}$)	330 ± 40	60 ± 40	170 ± 60	230 ± 60	700 ± 400	50 ± 30	400 ± 300
Concentração Cu ($\mu\text{g/g}$)	14 ± 5	0	5 ± 4	20 ± 5	50 ± 30	3 ± 3	30 ± 10

Tabela A.4: Dados associados à concentração elementar média de As, Fe e Cu obtida em função das áreas analisadas, para o Grupo B

Área	Brânquias	Cérebro	Espinha	Inteiro	Intestinos	Músculo	Vísceras
Concentração As ($\mu\text{g/g}$)	3 ± 6	0	0	0	10 ± 20	0	5 ± 6
Concentração Fe ($\mu\text{g/g}$)	290 ± 50	30 ± 30	260 ± 70	190 ± 50	400 ± 300	30 ± 20	300 ± 200
Concentração Cu ($\mu\text{g/g}$)	11 ± 3	1 ± 2	5 ± 4	16 ± 2	26 ± 9	0	19 ± 5

Tabela A.5: Dados associados à concentração elementar média de As, Fe e Cu obtida em função das áreas analisadas, para o Grupo C

Área	Brânquias	Cérebro	Espinha	Inteiro	Intestinos	Músculo	Vísceras
Concentração As ($\mu\text{g/g}$)	0	0	0	0	0	0	0
Concentração Fe ($\mu\text{g/g}$)	200 ± 200	70 ± 20	200 ± 200	100 ± 200	200 ± 200	40 ± 20	70 ± 30
Concentração Cu ($\mu\text{g/g}$)	11 ± 4	4 ± 4	5 ± 4	12 ± 3	12 ± 3	2 ± 4	7 ± 5

Tabela A.6: Dados associados à concentração elementar média de As, Fe e Cu obtida em função das áreas analisadas, para o Grupo A

Área	Brânquias	Cérebro	Espinha	Inteiro	Intestinos	Músculo	Vísceras
Concentração As ($\mu\text{g/g}$)	2 ± 3	0	0	13 ± 8	70 ± 30	0	30 ± 20
Concentração Fe ($\mu\text{g/g}$)	330 ± 40	60 ± 40	170 ± 60	230 ± 60	700 ± 400	50 ± 30	400 ± 300
Concentração Cu ($\mu\text{g/g}$)	14 ± 5	0	5 ± 4	20 ± 5	50 ± 30	3 ± 3	30 ± 10

Tabela A.7: Dados associados à concentração elementar média de As, Fe e Cu obtida em função das áreas analisadas, para o Grupo B

Área	Brânquias	Cérebro	Espinha	Inteiro	Intestinos	Músculo	Vísceras
Concentração As ($\mu\text{g/g}$)	3 ± 6	0	0	0	10 ± 20	0	5 ± 6
Concentração Fe ($\mu\text{g/g}$)	290 ± 50	30 ± 30	260 ± 70	190 ± 50	400 ± 300	30 ± 20	300 ± 200
Concentração Cu ($\mu\text{g/g}$)	11 ± 3	1 ± 2	5 ± 4	16 ± 2	26 ± 9	0	19 ± 5

Tabela A.8: Dados associados à concentração elementar média de As, Fe e Cu obtida em função das áreas analisadas, para o Grupo C

Área	Brânquias	Cérebro	Espinha	Inteiro	Intestinos	Músculo	Vísceras
Concentração As ($\mu\text{g/g}$)	0	0	0	0	0	0	0
Concentração Fe ($\mu\text{g/g}$)	200 ± 200	70 ± 20	200 ± 200	100 ± 200	200 ± 200	40 ± 20	70 ± 30
Concentração Cu ($\mu\text{g/g}$)	11 ± 4	4 ± 4	5 ± 4	12 ± 3	12 ± 3	2 ± 4	7 ± 5

VALORES ASSOCIADOS À EDXRF COM GEOMETRIA TRIAXIAL

Tabela B.1: Dados associados à concentração elementar média de As, Fe e Cu obtida em cada grupo através da EDXRF com geometria triaxial

Grupo	Concentração As ($\mu\text{g/g}$)	Concentração Fe ($\mu\text{g/g}$)	Concentração Cu ($\mu\text{g/g}$)
C	6 ± 2	90 ± 40	1 ± 2
B	8 ± 3	130 ± 40	9 ± 4
A	70 ± 20	139 ± 8	13 ± 2

VALORES ASSOCIADOS À ICP-AES

Tabela C.1: Dados associados à concentração elementar média de As, Fe e Cu obtida em cada grupo através de ICP-AES

Grupo	Concentração As ($\mu\text{g/g}$)	Concentração Fe ($\mu\text{g/g}$)	Concentração Cu ($\mu\text{g/g}$)
C	0.2 ± 0.3	20 ± 10	0.3 ± 0.3
B	0.5 ± 0.9	60 ± 20	0.4 ± 0.4
A	12 ± 7	60 ± 30	4 ± 10

VALORES ASSOCIADOS À ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Tabela D.1: Resultados obtidos para cada biomarcador estudado

Grupo	C	B	A
Concentração MDA (nmol.mg^{-1} proteína total)	0.012 ± 0.002	0.03 ± 0.02	0.043 ± 0.003
Atividade GST ($\text{nmol.min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ proteína total)	78 ± 6	100 ± 30	110 ± 30
Atividade GPX ($\text{nmol.min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ proteína total)	8 ± 3	1.77 ± 0.08	2.5 ± 0.9
Percentagem de inibição SOD (%)	20 ± 20	29 ± 6	45 ± 2
Atividade CAT ($\text{nmol.min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ proteína total)	47 ± 7	42 ± 3	40 ± 6
Concentração Ub ($\mu\text{mol.mg}^{-1}$ proteína total)	0.15 ± 0.04	0.12 ± 0.06	0.25 ± 0.05



VALORES ASSOCIADOS À ANÁLISE ESTATÍSTICA

Tabela E.1: Análise estatística realizada para μ -EDXRF em relação à concentração de As por área. Os asteriscos indicam valores estatisticamente significativos ($p < 0.05$)

Área	Inteiro	Intestinos	Vísceras
C vs B	0.86	0.08	0.08
C vs A	0.03*	0.03*	0.03*
A vs B	0.02*	0.12	0.06

Tabela E.2: Análise estatística realizada para μ -EDXRF em relação à concentração de de Cu e Fe do peixe por inteiro

Elemento	Cu	Fe
C vs B	0.05	0.44
C vs A	0.05	0.29
A vs B	0.35	0.52

Tabela E.3: Análise estatística realizada para EDXRF com geometria triaxial em relação à concentração de As, Cu e Fe

Elemento	As	Cu	Fe
C vs B	0.28	0.08	0.08
C vs A	0.08	0.08	0.12
A vs B	0.12	0.44	1.00

Tabela E.4: Análise estatística realizada para ICP-AES em relação à concentração de As, Cu e Fe. Os asteriscos indicam valores estatisticamente significativos ($p < 0.05$)

Elemento	As	Cu	Fe
C vs B	0.38	0.08	0.03*
C vs A	0.03*	0.04*	0.02*
A vs B	0.03*	0.32	0.52

Tabela E.5: Análise estatística realizada para os biomarcadores estudados. Os asteriscos indicam valores estatisticamente significativos ($p < 0.05$)

Biomarcador	LPO	GST	GPX	SOD	CAT	Ub
C vs B	0.04*	0.29	0.04*	0.72	0.29	0.48
C vs A	0.04*	0.28	0.04*	0.04	0.28	0.04*
A vs B	0.51	0.48	0.13	0.03	0.72	0.08